



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016

**ANA RAQUEL DO
NASCIMENTO ROCHA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS
POLISSACARÍDEOS DA ÁGUA DAS SALINAS
DE AVEIRO**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016

**ANA RAQUEL DO
NASCIMENTO ROCHA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS
POLISSACARÍDEOS DA ÁGUA DAS SALINAS DE
AVEIRO**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Nunes, Investigadora de Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria do Rosário G. dos Reis Marques Domingues
Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor associado com agregação do Departamento de Química Universidade de Aveiro

Arguente

Prof. Doutor Fernando Herminio Ferreira Milheiro Nunes
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Cláudia Nunes pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e pela ajuda, disponibilidade e paciência ao longo deste ano.

Agradeço ao ICBAS, ao Professor Manuel Vilanova e à Doutora Alexandra Correia pela disponibilidade na realização dos ensaios de imunoestimulação no laboratório de imunologia do ICBAS.

Agradeço a todos os colegas do ResPoStA@UA por todo o apoio e ajuda transmitida. Agradeço especialmente à Sónia Ferreira e à Élia Maricato por toda a amizade, paciência e motivação que me deram durante este ano, à Rita Bastos pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário e à Angélica Rocha por todas as conversas nas nossas viagens. À Susana Messias e à Joana Lopes pela amizade ao longo deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, em especial à Vera, à Diana e à Joana pelo apoio e amizade incondicionais nestes últimos 6 anos.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, irmãos, avós e tia por estarem sempre presentes e por todo o apoio que me transmitiram durante este ano.

palavras-chave Polissacarídeos sulfatados, fracionamento, análise estrutural, atividade antioxidante, atividade imunoestimuladora

resumo

Os polissacarídeos sulfatados são polímeros de açúcares carregados negativamente devido à presença de grupos sulfato. Estes polissacarídeos têm um valor acrescentado pois têm atividade biológica, nomeadamente atividade antioxidante e imunoestimuladora. As fontes não animais mais importantes destes compostos são as algas marinhas, como as algas castanhas (fucoidanas), as algas verdes (ulvanas) e as algas vermelhas (carragenanas e agaranas). As atividades biológicas destes polissacarídeos são influenciadas pela sua estrutura primária, nomeadamente a composição em monossacarídeos, o tipo de ligações glicosídicas, os grupos funcionais, as ramificações e o peso molecular. Dado que estes polissacarídeos se acumulam na água das salinas, o que facilita a sua obtenção, este trabalho tem como objetivo a purificação e caracterização estrutural dos polissacarídeos presentes nas águas das salinas de Aveiro. O seu potencial biológico foi também avaliado por determinação das atividades imunoestimuladora e antioxidante com vista a uma aplicação na área alimentar ou biomédica.

As amostras iniciais de água das salinas apresentaram um rendimento de material polimérico de 369 mg/L, sendo constituída maioritariamente por açúcares (40 a 45%), proteína (11 a 17%) e ésteres de sulfato (3%). Os resíduos de monossacarídeos maioritários são os ácidos urónicos (35 a 42%mol), galactose (10 a 13%mol) e fucose (10%mol). A análise de metilação mostrou a presença de ligações glicosídicas características de polissacarídeos de ambientes marinhos.

O material polimérico foi purificado por cromatografia de troca iónica e exclusão molecular. A cromatografia de troca iónica permitiu separar três grupos de polissacarídeos de acordo com os seus teores em sulfato (0 µg/mg, 20 µg/mg e 60 µg/mg). Em geral, estas frações apresentaram uma composição em açúcares semelhante, sendo os ácidos urónicos os resíduos maioritários (29 a 45%mol), seguidos da fucose (11 a 22%mol), galactose (10 a 14%mol), glucose (9 a 12%mol), xilose (5 a 11%mol), manose (5 a 10%mol), ramnose (6 a 8%mol) e arabinose (2 a 6%mol). Cada uma destas frações deu origem a quatro populações de polissacarídeos com diferentes pesos moleculares, sendo as duas populações de peso molecular aparente mais elevado as mais ricas em açúcares (201 e 322 µg/mg). A composição em monossacarídeos destas frações é muito semelhante à das amostras iniciais. As amostras iniciais (material polimérico) e as frações obtidas por troca iónica demonstraram ter atividade imunoestimuladora, não existindo diferenças significativas entre as frações da troca iónica que possuem diferentes teores em sulfato. Relativamente à atividade antioxidante (avaliada pelo método ABTS) verificou-se que nas condições testadas (50, 100 e 200 µg/mL) as amostras não apresentaram atividade.

O presente trabalho permitiu concluir que os polissacarídeos da água das salinas são compostos por uma mistura de polissacarídeos presentes nos meios marinhos. A homogeneidade das amostras em termos de estrutura como de atividades biológicas indica que a água das salinas é uma boa fonte de obtenção de polissacarídeos imunoestimuladores para aplicações biomédicas ou alimentares.

keywords

Sulfated polysaccharides, fractionation, structural analysis, antioxidant activity, immunostimulatory activity

abstract

Sulfated polysaccharides are negatively charged sugar polymers due to the presence of sulfate groups. These polysaccharides are valued due to their biological activity, namely as antioxidants and immunostimulators. The most important non animal source of these compounds are seaweeds, particularly brown algae (fucoidans), green algae (ulvans) and red algae (carrageenans and agarans). The biological activities are influenced by their primary structure, which include monosaccharide composition, type of glycosidic bonds, functional groups, branching and molecular weight. As salt pans water is rich in these polysaccharides, their extraction is facilitated. This work aims the purification and structural characterization of the polysaccharides found in the salt pans water of Aveiro. Its biological potential was also evaluated by determination of immunostimulatory and antioxidant activities, aiming for an application in the field of food industry or biomedicine.

Initial salt pans water samples had a polymeric material yield of 369 mg/L of sample, being composed mainly of sugars (40 to 45%), protein (11 to 17%) and sulfate esters (3%). Regarding its monosaccharide composition, the major residues are uronic acids (35 to 42%), galactose (10 to 13%) and fucose (10%). Methylation analysis showed the presence of glycosidic linkages that are characteristic of polysaccharides from marine environments.

The polymeric material was purified by ion exchange and size exclusion chromatographies. Ion exchange chromatography allowed the separation of three groups according to their sulfate content (0 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$). In general, these fractions showed a similar sugar composition with uronic acids as the major residue (29 to 45%), followed by fucose (11 to 22%), galactose (10 to 14%), glucose (9 to 12%), xylose (5 to 11%), mannose (5 to 10%), rhamnose (6 to 8%) and arabinose (2 to 6%). Each of these fractions yielded four populations of polysaccharides with different molecular weights wherein the two populations of apparent higher molecular weight are the ones with higher sugar content (201 and 322 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Monosaccharide composition were similar to the initial samples.

Initial samples (polymeric material) and fractions obtained by ion exchange chromatography have immunostimulatory activity, not showing significant differences between ion exchange fractions that have different sulfate content. Concerning antioxidant activity (determined by ABTS method), it was found that under tested conditions (50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) there was no activity.

In this work it was concluded that salt pans water is composed by a mixture of polysaccharides present in marine environments. The homogeneity of the fractions and their immunostimulatory activity shows that they can be used for biomedical and food applications.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Polissacarídeos Sulfatados	3
1.1.1 Fucoïdanas	4
1.1.2 Ulvanas	6
1.1.3 Carragenanas	7
1.1.4 Agaranas	10
1.1.5 Atividades Biológicas	10
1.1.5.1. Atividade Imunoestimuladora	11
1.1.5.2. Atividade Antioxidante	12
1.1.5.3. Outras atividades biológicas	15
1.2. Os ambientes marinhos costeiros - Salinas	16
1.3. Objetivos	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Preparação das amostras	21
2.2. Purificação e análise das amostras	21
2.2.1 Cromatografia de troca aniônica	21
2.2.2 Cromatografia de exclusão molecular	22
2.2.3 Método de Dubois	23
2.3. Hidrólise enzimática com proteases	23
2.4. Análise de açúcares neutros com hidrólise redutiva	23
2.5. Determinação de ésteres de sulfato por turbidimetria	25
2.6. Análise de ácidos urónicos	25
2.7. Análise de metilação	26
2.7.1 Dessulfatação	28
2.8. Análise elementar	28

2.9.	Avaliação da atividade imunoestimuladora	28
2.10.	Avaliação da atividade antioxidante	29
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1.	Caracterização das amostras de água da Ria de Aveiro.....	33
3.2.	Fracionamento por cromatografia de troca aniónica	39
3.3.	Fracionamento por cromatografia de exclusão molecular	44
3.4.	Hidrólise enzimática com proteases	48
3.5.	Avaliação de atividades biológicas	51
3.5.1.	Avaliação da atividade imunoestimuladora.....	51
3.5.2.	Avaliação da atividade antioxidante.....	55
4.	CONCLUSÃO	56
5.	BIBLIOGRAFIA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da heparina.....	3
Figura 2 – Classificação das fucoïdanas sugerida por Cumashi et al (32).	5
Figura 3 – Diferentes estruturas de fucoïdanas de algas castanhas (34).	5
Figura 4 – Estrutura dos dissacarídeos de repetição das ulvanas.	7
Figura 5 – Estrutura de um dissacarídeo de repetição de ulvanas contendo xilose.....	7
Figura 6 – Estrutura do dissacarídeo de repetição das carragenanas.....	8
Figura 7 – Diferentes tipos de carragenanas.....	9
Figura 8 – Estrutura do dissacarídeo de repetição das agaranas.....	10
Figura 9 - Salinas de Aveiro.	16
Figura 10 - Cromatogramas obtidos por GC-FID. 10A: exemplo de um cromatograma com o resíduo 3,6-anidrogactose; 10 B: cromatograma obtido na análise da amostra AS-FT (sem 3,6-anidrogactose).	35
Figura 11 – Perfis das amostras iniciais de água das salinas obtidos por cromatografia de troca iónica.	40
Figura 12 – Perfis cromatográficos das amostras AS-A_NaCl 0,125 M, AS-A_NaCl 0,25 M e AS-A_NaCl 0,5 M eluídas na coluna de cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-300.....	46
Figura 13 – Perfis cromatográficos das amostras AS-A_inicial e AS-A – Grupo I hidrolisado e AS-A – Grupo II hidrolisado eluídas na coluna de cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-300.....	49
Figura 14 – Citogramas obtidos nos ensaios de imunoestimulação do controlo negativo (RPMI), controlo positivo (LPS), e amostras AS-B_inicial, AS-B_0,125M e AS-B_0,125M – Grupo II.	52
Figura 15 – Percentagem de estimulação dos linfócitos B nas amostras iniciais.....	53
Figura 16 – Percentagem de estimulação dos linfócitos B nas frações obtidas por cromatografia de troca iónica.	54
Figura 17 – Percentagem de estimulação dos linfócitos B nas frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular.	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Composição ($\mu\text{g}/\text{mg}$) do material polimérico das amostras iniciais.....	34
Tabela 2 – Composição em monossacarídeos (% molar) das amostras de água da Ria de Aveiro.	34
Tabela 3 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados das amostras de água sulfatadas e dessulfatada.	38
Tabela 4 – Rendimento e composição ($\mu\text{g}/\text{mg}$) das frações obtidas por cromatografia de troca iónica das amostras iniciais AS-A e AS-B.	41
Tabela 5 – Composição em açúcares (% molar) dos grupos de polissacarídeos recolhidos na cromatografia de troca iónica.	42
Tabela 6 – Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados das frações obtidas por cromatografia de troca iónica.	43
Tabela 7 – Composição em açúcares (%molar) e rendimento (%m/m) dos grupos de polissacarídeos recolhidos na cromatografia de exclusão molecular.	46
Tabela 8 – Composição em açúcares (%molar) dos grupos de polissacarídeos recolhidos na cromatografia de exclusão molecular.	50

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AS – Água das salinas

AS_0,125 M – fração obtida por cromatografia de troca iónica eluída com NaCl 0,125 M

AS_0,25 M - fração obtida por cromatografia de troca iónica eluída com NaCl 0,25 M

AS_0,5 M – fração obtida por cromatografia de troca iónica eluída com NaCl 0,5 M

AS-A – amostra de água das salinas recolhida em setembro de 2013

AS-B – amostra de água das salinas recolhida em outubro de 2013

AS-B_DS - amostra de água das salinas recolhida em outubro de 2013 dessulfatada

AS-FT – Água das salinas obtida do fundo do tanque de recolha

BHA – Butil-hidroxianisol

BHT – Butil-hidroxitolueno

BSA – Albumina de soro bovino

DEAE – Dietilaminoetilo

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo

GC-FID – Cromatógrafo de gás com detetor de ionização de chama

GS-FT – Gel das salinas obtido do fundo do tanque de recolha

HexA – Ácidos urónicos

LPS – Lipopolissacarídeo

MFF – m-fenilfenol

MMB – Complexo borano-4-metilmorfolina

PBS - Tampão fosfato-salino 0,01 M, pH 7,4

ROS – Espécies reativas de oxigénio

RPMI - 1640 – Roswell Park Memorial Institute médium

TCA – Ácido tricloroacético

TFA – Ácido trifluoroacético

1. INTRODUÇÃO

1.1. Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados são polímeros de açúcares carregados negativamente, devido à presença de grupos sulfato. Estes compostos são encontrados em tecidos animais (vertebrados e invertebrados) e vegetais (algas marinhas) (1).

Em geral, a presença de polissacarídeos sulfatados pode ser associada com a adaptação do organismo a ambientes salinos, como por exemplo ambientes marinhos (2). As algas marinhas são organismos que produzem muito maiores quantidades de polissacarídeos do que as plantas terrestres, sendo, juntamente com os animais, a fonte mais importante de polissacarídeos sulfatados (3). Estes polissacarídeos são bastante diferentes dos que são encontrados em outras plantas, especialmente no que diz respeito à presença de grupos sulfato e resíduos de açúcar não comuns (como a ramnose sulfatada ou o ácido idurônico (4,5)), elevado teor de grupos iônicos, elevada solubilidade em água e propriedades reológicas que permitem que estes polissacarídeos sejam utilizados como agentes gelificantes e espessantes (2,6,7). Destas propriedades estruturais resulta uma grande variedade de características, sendo a base da sua elevada aplicabilidade industrial.

A estrutura química dos polissacarídeos sulfatados é bastante similar à estrutura de glicosaminoglucanas, uma vez que contêm ácido idurônico e grupos sulfato (Figura 1). Estes compostos são produzidos pelos animais e apresentam atividade biológica, uma vez que as proteoglicanas de sulfato de condroitina, que são produzidos por macrófagos em locais de inflamação (8), têm sido descritos como mediadores do processo de inflamação (9) e a heparina é amplamente utilizada como um agente anti-coagulante (10). Contudo, há uma necessidade de procura de compostos provenientes de fontes vegetais com atividade biológica semelhante que os possam substituir, como por exemplo os polissacarídeos sulfatados provenientes de ambientes marinhos.

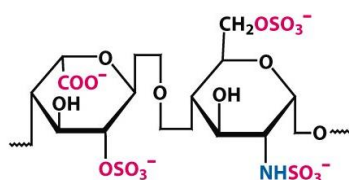


Figura 1 – Estrutura da heparina
(L-IdoA-2S-(α 1 \rightarrow 4)-D-GlcN-NS,6S)

Existe um elevado grau de variabilidade estrutural entre os polissacarídeos sulfatados que é atribuído a vários fatores, nomeadamente a espécie de alga de onde são extraídos

(11,12), a sua localização geográfica (13,14), as suas condições de crescimento (15) e o seu estado de desenvolvimento (16), bem como os métodos de extração e de purificação utilizados (17). Existe inconsistência entre quais são os monossacarídeos sulfatados, o número total de grupos sulfato, e a posição em que os grupos sulfato estão ligados (isto é, sulfatos ligados aos grupos hidroxilo de C-2, C-3, C-4, C-6). Uma consequência importante desta diversidade estrutural é que cada estrutura pode ter atividades biológicas diferentes (12).

No geral, estes polissacarídeos possuem várias atividades biológicas importantes, tais como antioxidante (18,19), imunoestimuladora (20,21), anti-inflamatória (22), anticoagulante (23), anti-tumoral (24) e anti-viral (25). A relação entre a estrutura e as atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados de algas ainda não está claramente estabelecida, mas sabe-se que estas atividades biológicas dependem da sua estrutura química, particularmente do grau de sulfatação, peso molecular e conformação da cadeia (26). Devido a estas funções biológicas com efeitos benéficos de saúde, os polissacarídeos sulfatados derivados de algas marinhas têm um grande potencial como ingredientes funcionais para a preparação de produtos alimentares, farmacêuticos e nutracêuticos.

As algas marinhas podem ser divididas em três grandes grupos: algas castanhas (*Phaeophyceae*), algas verdes (*Chlorophyceae*) e algas vermelhas (*Rhodophyceae*) (4). Estas algas diferem também na sua constituição em polissacarídeos da parede celular (27): fucanas (fucoidanas) nas algas castanhas, ramnanas (ulvanas) nas algas verdes e galactanas (agaranas e carragenanas) nas algas vermelhas (28).

1.1.1 Fucoïdanas

As fucoïdanas são polissacarídeos constituídos por uma cadeia principal de resíduos de L-fucose sulfatada, sendo maioritariamente produzidos por algas castanhas, normalmente do género *Fucus*, e alguns invertebrados marinhos (29). Em termos de propriedades reológicas, as fucoïdanas são estáveis em soluções salinas e a sua viscoelasticidade é elevada numa vasta gama de pH (30). Assim, estes compostos podem ser utilizados nas indústrias alimentares e cosméticas pois são adequados como agentes estabilizantes e espessantes. Estes polissacarídeos têm sido bastante estudados uma vez que apresentam várias atividades biológicas, como anti-coagulante, anti-viral, anti-tumoral, imunomoduladora, antioxidante e anti-inflamatória (31).

As fucoidanas são compostas por uma cadeia linear de resíduos de α -L-fucose em ligações (1 \rightarrow 3) ou (1 \rightarrow 4). Dependendo do tipo de ligação presente na estrutura, podem ser classificadas em dois grupos (32): o grupo I, em que a cadeia principal é constituída apenas por resíduos de α -L-fucose em ligação (1 \rightarrow 3), e o grupo II, em que a cadeia principal é constituída por ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) alternadas (Figura 2). Os resíduos de fucose podem conter grupos sulfato no carbono 2 ou no carbono 4 e podem também ser ramificados com pequenas cadeias de fucose no carbono 2, 3 ou 4 (Figura 3) (33). A fucoidana pode ainda ser constituída por outros monossacarídeos, tais como manose, galactose, glucose, xilose ou ácidos urónicos e ter grupos acetilo.

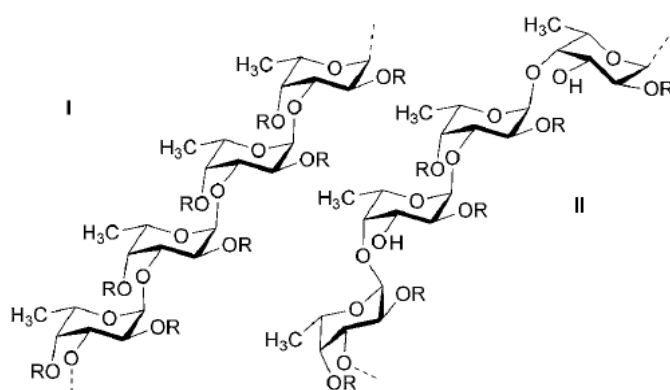
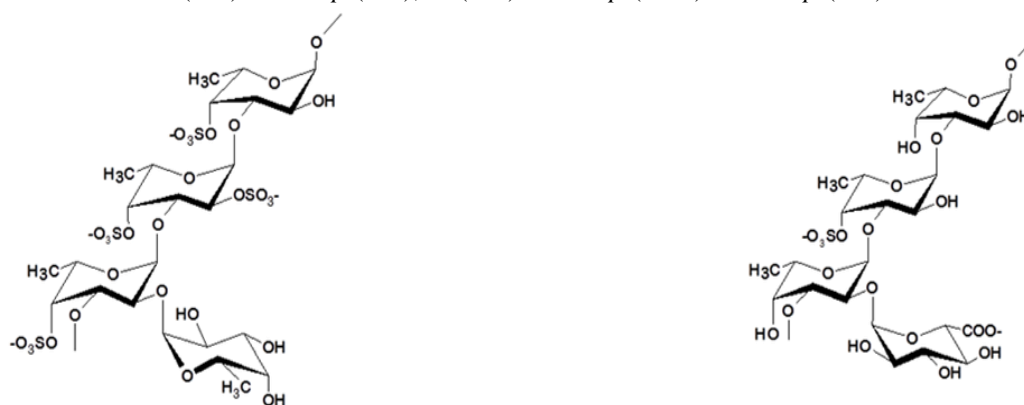


Figura 2 – Classificação das fucoidanas sugerida por Cumashi et al (32).

I: (\rightarrow 3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow); II: (\rightarrow 3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow)



Laminaria saccharina

Cadeia principal constituída por α -L-Fucp-4S-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp-2S,4S (1 \rightarrow) com ramificação em C-2 com um resíduo de α -L-Fucp

Cladosiphon okamuranus

Cadeia principal constituída por α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp-4S (1 \rightarrow) com ramificações em C-2 com um resíduo de ácido glucurónico

Figura 3 – Diferentes estruturas de fucoidanas de algas castanhas (34).

1.1.2 Ulvanas

As ulvanas são os principais polissacarídeos encontrados nas algas verdes, nomeadamente nos géneros *Ulva* e *Enteromorpha*. Este polissacarídeo, que é responsável por 18-29% da fração de hidratos de carbono de algas verdes (35), está distribuído por toda a alga, sendo predominante no interior do espaço intercelular e na parede fibrilar (36). Dentro desta porção da parede celular, sugere-se que a ulvana pode ser disposta numa estrutura granulosa, estabilizadas por proteínas da parede celular ou ligações covalentes (37).

As ulvanas, como parte da parede celular de algas verdes, possuem funções osmóticas, incluindo um papel no equilíbrio iónico ou na prevenção de dessecação das algas devido à sua natureza altamente higroscópica (38). As ulvanas parecem inibir a atividade da celulase, o que indica um papel protetor da α -celulose da parede celular, protegendo-a do ataque de bactérias marinhas. Esta função de proteção também está relacionada com o facto de as ulvanas estarem associadas com a baixa porosidade de algas verdes (36). A presença de ácidos na cadeia das ulvanas, particularmente ácido glucurónico e idurónico, pode indicar que este polissacarídeo está também envolvido na coesão da parede celular (39). Pensa-se também que as ulvanas estão relacionadas com a capacidade das algas verdes de remover metais pesados de águas contaminadas através de ligações covalentes, interações eletrostáticas ou reações de oxidação-redução. Estes polissacarídeos contêm grupos funcionais, nomeadamente hidroxilos e sulfatos, que podem funcionar como locais de ligação para os metais (27,40).

As ulvanas são heteropolissacarídeos sulfatados compostos por resíduos de ramnose, xilose, ácido glucurónico e ácido idurónico. A quantidade de cada resíduo de monossacarídeo ou a sua organização no próprio polissacarídeo pode variar de acordo com diferentes fatores, como por exemplo o método de extração (41), a distribuição geográfica (42), a espécie (41) ou a sazonalidade (16), existindo por isso uma grande complexidade e variabilidade de estruturas de ulvanas.

As ulvanas têm dois tipos de unidades estruturais principais: os ácidos ulvanobiurónicos do tipo A e do tipo B. O tipo A consiste no ácido- β -D-glucurónico ligado a α -L-ramnose-3-sulfato por ligações (β 1 \rightarrow 4) e o tipo B consiste no ácido α -L-idurónico ligado a α -L-ramnose-3-sulfato por ligações (α 1 \rightarrow 4) (Figura 4) (39).

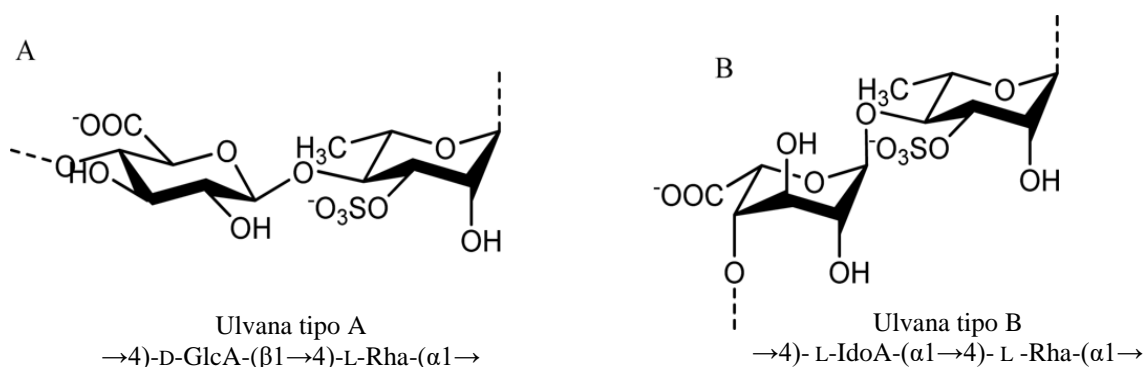


Figura 4 – Estrutura dos dissacarídeos de repetição das ulvanas.

Contudo, dependendo da espécie da alga produtora dos polissacarídeos, esta estrutura pode ter variações, nomeadamente na posição dos grupos sulfato, estando descrita a sua presença no carbono 2 ou 3 da ramnose (43,44) e na ramificação de resíduos de ramnose ou de ácido glucurónico com resíduos de xilose (Figura 5). A cadeia principal pode ter ramificações constituídas por resíduos únicos de ácidos urónicos no carbono 2 (45) ou no carbono 4 (46) da ramnose. Ulvanas da alga *Ulva rígida* contêm na sua estrutura resíduos de xilose, estando a xilose e a ramnose sulfatadas em C-2 (43).

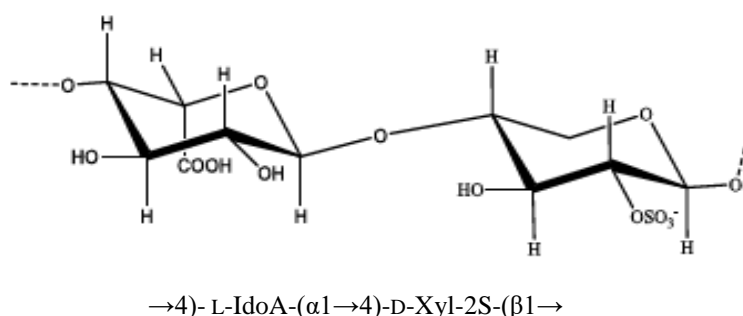


Figura 5 – Estrutura de um dissacarídeo de repetição de ulvanas contendo xilose.

1.1.3 Carragenanas

As carragenanas são polissacarídeos obtidos a partir da parede celular de algas vermelhas do género *Rhodophyta* (47). Estes polissacarídeos são bastante utilizados na indústria alimentar devido às suas propriedades como agente espessante, gelificante e estabilizante, sendo também utilizados na indústria farmacêutica e de cosméticos.

Estes compostos são solúveis em água, contudo a sua solubilidade depende do teor em grupos sulfato e dos catiões associados a esses grupos, por exemplo o sódio, potássio, cálcio e magnésio. Assim, a proporção do teor em sulfatos e o equilíbrio dos catiões na

solução aquosa vai determinar a viscosidade do gel formado pela carragenana. Esta viscosidade depende da concentração, da temperatura, da presença de outros solutos, do tipo de carragenana e do respetivo peso molecular (48), sendo que a viscosidade do gel aumenta exponencialmente com o aumento da concentração do polissacarídeo, diminuindo com o aumento da temperatura (49). O aumento da viscosidade pode ocorrer através de dois mecanismos distintos: por um lado, pode ocorrer interação entre as cadeias lineares das carragenanas, ocorrendo uma diminuição do espaço livre ou aumento do volume; por outro lado, pode ocorrer reticulação entre as cadeias. No primeiro mecanismo, o aumento da concentração do polissacarídeo permite uma maior interação entre as cadeias e a presença de sais pode diminuir a viscosidade ao reduzir a repulsão eletrostática entre grupos sulfato. O segundo caso ocorre especialmente com κ - e ι -carragenanas, uma vez que com pequenas concentrações de sais e com baixa temperatura pode ocorrer gelificação da solução de carragenana, com o consequente aumento da viscosidade (50).

As carragenanas são um grupo de polissacarídeos compostos por uma cadeia linear de galactanas sulfatadas, com resíduos alternados de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 3$) ou ($\beta 1 \rightarrow 4$), sendo o dissacarídeo de repetição das carragenanas (Figura 6) (49). No entanto, para além dos resíduos de galactose e dos grupos sulfato, também podem estar presentes na estrutura outros açúcares como a xilose, a glucose ou ácidos urónicos, assim como grupos piruvato ou ésteres de metilo (51).

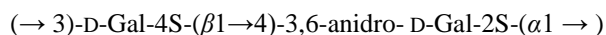
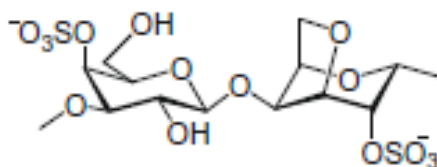


Figura 6 – Estrutura do dissacarídeo de repetição das carragenanas.

Estes polissacarídeos são classificados de acordo com a presença/ausência do resíduo 3,6-anidro-D-galactose, grau de sulfatação e posição dos grupos sulfato (50,52), sendo divididos em seis grupos: iota (ι)-, kappa (κ)-, lambda (λ)-, mu (μ)-, nu (ν)- e theta (θ)-carragenana (Figura 7). Esta nomenclatura é importante, tanto para a sua classificação química como para a sua produção comercial, uma vez que os diferentes tipos de carragenanas são extraídas de espécies diferentes de algas e possuem propriedades muito

diferentes (50). Os três principais tipos de carragenanas são a kappa, a iota e a lambda, que contêm, respectivamente um, dois e três grupos de ésteres de sulfato na sua constituição, resultando num grau de sulfatação de 20%, 33% e 41% (w/w) (53). Na κ -carragenana o éster de sulfato está ligado em C-4 do resíduo de D-galactose, enquanto na ι -carragenana e na λ -carragenana os ésteres de sulfato estão ligados em C-2 e C-6. Para além dos diferentes graus de sulfatação, estes três tipos de carragenanas também diferem no teor de 3,6-anidro-D-galactose, uma vez que o conteúdo deste resíduo na κ -carragenana é de 28 a 35% e na ι -carragenana é de 25 a 30%, não estando presente na λ -carragenana. Relacionando a composição dos diferentes tipos de carragenanas com a sua capacidade gelificante verifica-se que elevados conteúdos de 3,6-anidro-D-galactose leva a um aumento desta capacidade, enquanto um maior grau de sulfatação leva a uma menor capacidade gelificante (49).

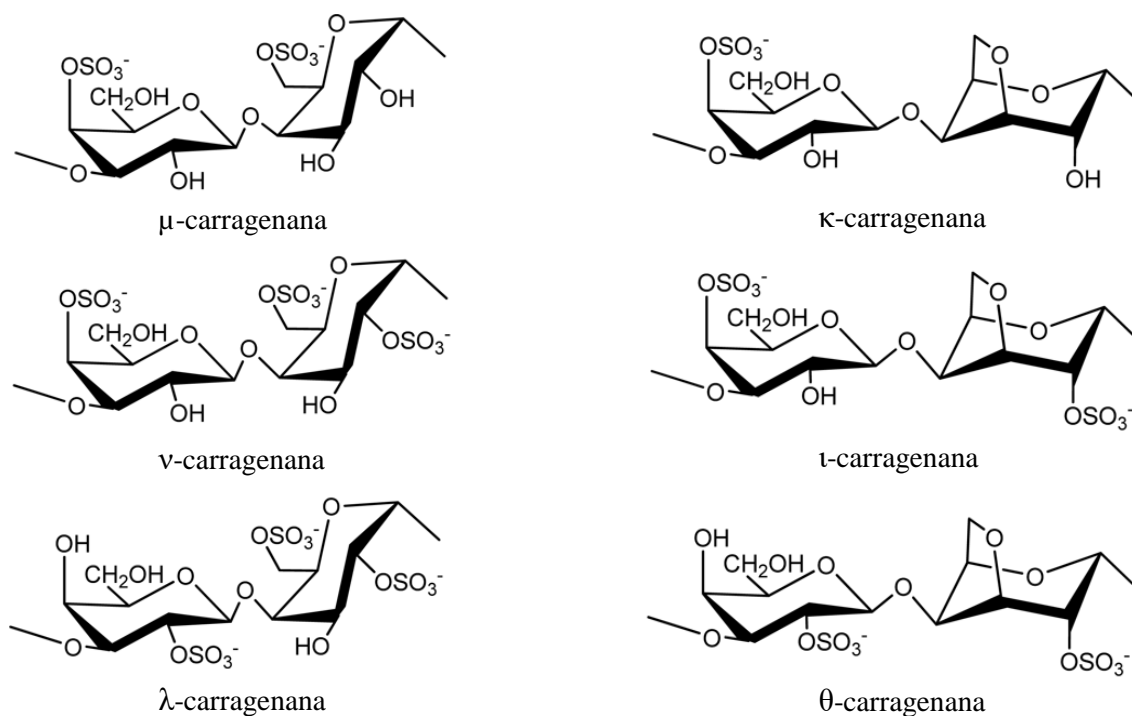


Figura 7 – Diferentes tipos de carragenanas.

1.1.4 Agaranas

As agaranas são, tal como as carragenanas, galactanas sulfatadas sintetizadas por algas vermelhas. Contudo, enquanto as carragenanas apenas têm na sua estrutura resíduos de galactose da série D, as agaranas são constituídas na sua cadeia principal por resíduos alternados de β -D- galactose com α -L-galactose, em ligação (1 \rightarrow 4) ou (1 \rightarrow 3), ou com a 3,6-anidro- α -L-galactose, em ligação (1 \rightarrow 4) (Figura 8). Dependendo da fonte a partir da qual são extraídas, pode variar o teor em 3,6-anidro-galactose e as agaranas podem também conter substituições com ésteres de sulfato, nomeadamente em C-2 ou em C-6 (54), ésteres de metilo (ligados em C-2 no resíduo de 3,6-anidro- α -L-galactose, e α -L-galactose e C-6 no resíduo de β -D- galactose) (55) ou resíduos de D-xilose (ligados em C-3 no resíduo de α -L-galactose (56) ou C-4 nos resíduos de β -D- galactose (55)). Contudo, comparativamente às carragenanas, as agaranas têm menor quantidade de grupos sulfato e, por outro lado, são mais ricas em substituições com grupos metilo ou com piruvato (55,57).

Estes polissacarídeos, tal como as carragenanas, apresentam uma grande variabilidade estrutural, estando as suas propriedades físicas, nomeadamente a formação de géis, e atividades biológicas relacionadas com a presença de resíduos de 3,4-anidro-galactose e com a substituição com grupos sulfato (58).

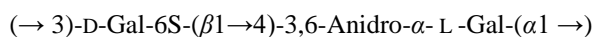
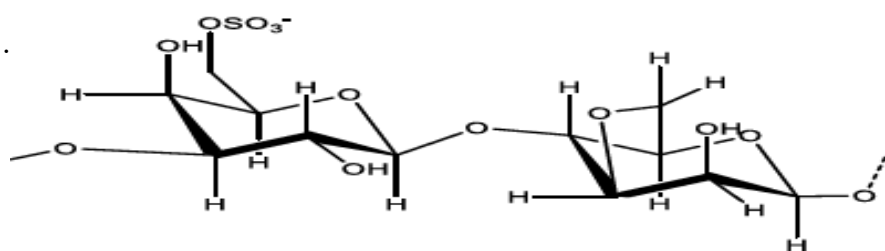


Figura 8 – Estrutura do dissacarídeo de repetição das agaranas.

1.1.5 Atividades Biológicas

Os polissacarídeos sulfatados têm sido bastante estudados no que respeita às suas propriedades biológicas e à sua utilização tanto na indústria farmacêutica como na indústria alimentar, podendo estes compostos ser considerados ingredientes funcionais

(18,59). Contudo, apesar dos vários estudos desenvolvidos e de se verificar que a presença dos grupos sulfato está relacionada com as atividades biológicas apresentadas por estes polissacarídeos, a relação entre a estrutura e as atividades biológicas ainda não está completamente esclarecida (60). Neste trabalho estão descritas algumas das principais atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados: atividade antioxidante e atividade imunoestimuladora.

1.1.5.1. Atividade Imunoestimuladora

Polissacarídeos imunoestimuladores são compostos capazes de interagir com o sistema imunitário e aumentar os mecanismos específicos da resposta do hospedeiro. As características estruturais que têm sido relacionadas com esta propriedade são a composição em monossacarídeos do composto, o tipo de ligações glicosídicas, os grupos funcionais, as ramificações, a conformação e o peso molecular (61). A atividade imunoestimuladora dos polissacarídeos sulfatados é baseada essencialmente na modulação de macrófagos. Os macrófagos são células com um papel extremamente importante na manutenção da homeostase, sendo uma fonte predominante de fatores pró-inflamatórios (28).

A atividade imunomoduladora das fucoidanas já foi estudada, verificando que as fucoidanas tinham a capacidade de restaurar as funções do sistema imunológico de ratos com a imunidade comprometida, funcionando como imunomoduladores e atuando diretamente sobre macrófagos e linfócitos T (62). Um outro estudo sobre a atividade imunomoduladora das fucoidanas foi realizado por Raghavendran *et al.* (63), tendo sido observado que a fucoidana atenuou de forma significativa o dano na mucosa gástrica dos ratos, e que este efeito protetor é dependente, entre outros fatores, da modulação de citocinas anti-inflamatórias e da ativação das ciclooxygenases.

Os efeitos imunoestimuladores das fucoidanas em células dendríticas também já foram estudados (64,65), verificando-se que os polissacarídeos induzem a maturação destas células. De forma a avaliar a influência da estrutura química dos polissacarídeos nesta atividade biológica, Barahona *et al.* (66) modificou os polissacarídeos iniciais através de processos de sulfatação, dessulfatação e hidrólise parcial. Com base nos resultados obtidos, os autores verificaram que a atividade imunoestimuladora diminuía quer com o

aumento quer com a diminuição do teor em grupos sulfato, levando a concluir que esta atividade está dependente não do grau de sulfatação mas do padrão de sulfatação inicial.

Os efeitos imunoestimuladores de extratos de diferentes espécies de algas, incluindo *Ulva rígida*, foram comprovados, estando relacionados com a presença de determinados polissacarídeos, como as ulvanas (67). O mesmo resultado também foi obtido por Leiro *et al.* (68), que verificou um aumento na ativação dos macrófagos através do aumento dos níveis de prostaglandinas (nomeadamente, PGE₂), do aumento da produção de óxido nítrico e regulação da expressão de genes associados a reações pró-inflamatórias, sendo este um processo fundamental na defesa do hospedeiro contra microrganismos. Dado que os autores estudaram também os polissacarídeos dessulfatados e verificaram uma diminuição significativa no efeito imunoestimulador, concluiu-se que esta atividade está relacionada com a presença de grupos sulfato e também com a dose e o tempo de exposição ao polissacarídeo.

Relativamente às carragenanas, existem vários estudos que avaliam a sua atividade imunoestimuladora. Stephanie *et al.* (69) avaliou esta atividade em diferentes oligossacarídeos derivados de ι- carragenana extraída da espécie de alga vermelha *Solieria chordalis*, concluindo a ocorrência de um aumento da imunidade inata através da ação de células *natural killer* e de neutrófilos. A administração de carragenanas leva a uma ativação dos macrófagos, ocorrendo um aumento na fagocitose (68) e também a um aumento na imunidade celular, nomeadamente na proliferação de linfócitos (70).

Pelos resultados apresentados nos diversos estudos é possível concluir que a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos sulfatados está comprovada. Assim sendo, estes polissacarídeos têm o potencial de serem utilizados como agentes estimuladores da resposta imunitária.

1.1.5.2. Atividade Antioxidante

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são moléculas extremamente reativas que são produzidas constantemente no nosso organismo. Em condições fisiológicas normais, as ROS são produzidas em pouca quantidade, uma vez que são necessárias para a manutenção do funcionamento normal das funções celulares, sendo contrabalançadas pelos sistemas antioxidantes endógenos de forma a evitar qualquer efeito negativo. Contudo, quando o oxigénio é fornecido em excesso ou a sua redução é insuficiente, ROS

são gerados na forma de anião superóxido, radical hidroxilo e peróxido de hidrogénio, o que leva a um distúrbio nos mecanismos antioxidantes de defesa por acumulação excessiva de radicais livres, resultando em stress oxidativo (71). O stress oxidativo, por sua vez, aumenta a formação de ROS que são capazes de reagir com os lípidos da membrana, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outras pequenas moléculas, resultando em danos celulares. De entre vários efeitos patológicos destaca-se o facto de poderem causar carcinogénese, artrite reumatoide (72) e doenças neurodegenerativas (73).

Para além disso, a deterioração de certos alimentos tem origem na oxidação lipídica. A oxidação lipídica realizada pelas ROS, nomeadamente pelo anião superóxido, radicais hidroxilo e peróxido de hidrogénio, provoca uma diminuição do valor nutricional dos lípidos nos alimentos, afetando a sua aparência e sabor (74) e acelerando a sua deterioração (75). Por esse motivo têm sido utilizados muitos antioxidantes comerciais sintéticos, tais como butil-hidroxianisol (BHA) ou o butil-hidroxitolueno (BHT) nas indústrias alimentares e farmacêuticas, com o objetivo de retardar os processos de oxidação e de peroxidação. No entanto, a utilização destes antioxidantes sintéticos está sob regulamentação rigorosa devido aos potenciais riscos para a saúde que eles apresentam (76). Assim, a procura de antioxidantes naturais como fontes alternativas seguras é importante na indústria alimentar, estando os polissacarídeos sulfatados incluídos nesse grupo de compostos alternativos.

A atividade antioxidante das fucoidanas tem sido bastante estudada, sendo um bom antioxidante natural, com elevado potencial para a prevenção de doenças mediadas por radicais livres. Chattopadhyay *et al.* (77) avaliou a atividade antioxidante da fucoidana isolada da alga castanha *Turbinaria conoides*, concluindo que, comparativamente ao BHA, apresentava uma ótima capacidade de captação do radical DPPH, nomeadamente 61% para doses de 1 mg/mL e 90% para doses de 5 mg/mL. As fucoidanas têm um efeito inibidor relativamente à formação do radical hidroxilo e do radical superóxido, existindo uma correlação positiva entre o teor em sulfatos e a atividade antioxidante da fucoidana, uma vez que um alto grau de sulfatação leva a uma atividade antioxidante mais elevada (59,78). Esta propriedade permite ter um efeito protetor na peroxidação lipídica, por capacidade de eliminar o radical superóxido (79).

A atividade antioxidante também tem sido descrita para as ulvanas (80–83). Qi *et al.* (80) estudou a atividade antioxidante *in vitro* de ulvanas com teores diferentes de grupos sulfato, determinando a sua capacidade de captação de radicais hidroxilo e de radicais

superóxido, o seu efeito quelante em iões ferro e o seu poder de redução. Tal como no caso das fucoidanas, as ulvanas com maior teor de grupos sulfato têm uma maior atividade antioxidante. Contudo, outro estudo demonstrou que os polissacarídeos que apresentavam uma maior atividade tinham um menor teor de grupos sulfato (81). Uma explicação para estes resultados consiste no facto de que a atividade antioxidante não resulta apenas da presença de grupos sulfato, mas de um conjunto de outros fatores tais como o peso molecular, o teor em ácidos urónicos e o teor proteico (81,83). Assim sendo, são necessários mais estudos para esclarecer a relação entre a estrutura e as atividades biológicas. Li *et al.* (82) estudou o efeito da degradação de polissacarídeos, nomeadamente ulvanas extraídas da espécie *Enteromorpha prolifera*. Este estudo demonstrou que tanto o polissacarídeo inicial como os obtidos após um processo de hidrólise (menor massa molecular) apresentavam capacidade antioxidante. Contudo, os polissacarídeos com maior massa molecular apresentaram maiores efeitos inibidores apenas relativamente ao radical superóxido, pois tanto na inibição do radical hidroxilo, como no poder redutor e no efeito quelante foram os polissacarídeos com menor massa molecular que apresentaram efeitos superiores aos polissacarídeos iniciais. Estes resultados indicam que a massa molecular é um fator relevante na atividade antioxidante destes polissacarídeos uma vez que o teor em sulfatos e a composição em monossacarídeos eram semelhantes nas amostras estudadas.

Comparativamente às fucoidanas, as carragenanas possuem uma atividade antioxidante inferior (59). Dentro do grupo das carragenanas, a ι-carragenana é o polissacarídeo com maior efeito de inibição do radical hidroxilo, quando comparada com a λ- e a κ- carragenanas (59). A atividade antioxidante de oligossacarídeos de carragenanas também já foi estudada, verificando-se que oligossacarídeos de κ-carragenana modificados quimicamente, isto é com diferentes graus de sulfatação, acetilação e fosforilação, apresentavam uma atividade antioxidante superior aos oligossacarídeos iniciais (71).

A atividade antioxidante das agaranas da alga vermelha *Gracilaria birdiae* foi avaliada permitindo verificar que as agaranas têm a capacidade de inibir a formação do radical DPPH e do radical hidroxilo, sendo este efeito dependente da concentração do polissacarídeo (84).

Com base nos resultados descritos acima é então possível afirmar que os mecanismos da atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados são variados passando pela

capacidade de sequestrar ROS ou impedir a sua formação, pela capacidade de prevenir a peroxidação lipídica e pela quelação de metais. Estas propriedades dos polissacarídeos tornam possível a sua utilização, tanto na indústria farmacêutica, nomeadamente no tratamento de doenças associadas ao stress oxidativo, como na indústria alimentar em substituição dos antioxidantes sintéticos como o BHA ou o BHT.

1.1.5.3. Outras atividades biológicas

Tem sido descrito que os polissacarídeos sulfatados ao interagirem com proteínas, tais como citocinas e quimiocinas, podem desempenhar duas funções na resposta imunitária: inibidor e promotor. Como inibidores da resposta imune, estes polissacarídeos bloqueiam a transdução do sinal inflamatório induzida pelas citocinas pró-inflamatórias, suprimindo assim a ativação do sistema complemento e interferindo com o processo de migração dos leucócitos até aos locais da inflamação. Por outro lado, estes compostos podem também promover o processo de reconhecimento do antígeno e aumentar a proliferação dos linfócitos. Todas estas funções são influenciadas pela estrutura dos polissacarídeos, nomeadamente pelo peso molecular, grau de sulfatação e posição dos grupos sulfatos (60,85). De forma a estudar a atividade anti-inflamatória, Siqueira *et al.* (22) estudou os efeitos celulares e vasculares *in vivo* de uma fucoidana da espécie *Lobophora variegata* em modelos de inflamação aguda. Os autores concluíram que este polissacarídeo apresentava atividade anti-inflamatória, uma vez que se verificou uma inibição do edema, um aumento da permeabilidade vascular e um aumento da migração dos neutrófilos. A fucoidana da espécie de alga castanha *Sargassum vulgare* demonstrou atividade anti-inflamatória em modelos de inflamação aguda (19), verificando-se a redução do edema em todas as concentrações testadas. Tendo em consideração os resultados mencionados acima, as fucoidanas têm potencial para serem utilizadas como agentes anti-inflamatórios. Contudo, é necessária a realização de mais estudos de forma a verificar se esta propriedade é transversal a todos os polissacarídeos sulfatados.

As atividades antiproliferativa e anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de origem marinha também já se foram estudadas. El-Baky *et al.* (86) estudou o efeito do tratamento com extratos de ulvanas em linhagens de células tumorais MCF-7 e HepG2 e verificou a existência de atividade antiproliferativa dependente da concentração, sendo esta superior nos extratos com maior teor em sulfatos e ácidos urónicos. O mesmo estudo

avaliou a atividade anticoagulante dos extratos de ulvanas e verificou que esta atividade é dependente da concentração, tendo os autores considerado que este tipo de polissacarídeos apresenta potencial para ser utilizado na indústria farmacêutica com funções semelhantes às da heparina.

Tendo em conta as atividades biológicas apresentadas por estes polissacarídeos é possível concluir que têm bastante potencial para serem utilizados na indústria farmacêutica e alimentar. Assim sendo é necessário encontrar fontes ricas neste tipo de compostos e que sejam alternativas às algas, de forma a facilitar o processo de obtenção destes polissacarídeos.

1.2. Os ambientes marinhos costeiros - Salinas

Os ambientes marinhos contêm vários compostos orgânicos, tais como ácidos gordos poli-insaturados, polissacarídeos, péptidos, minerais e vitaminas (87). Existem já estudos realizados sobre a presença de polissacarídeos sulfatados na água das salinas e no sal (88,89), que aparentemente têm origem nas algas, e com bastante interesse devido às atividades biológicas que possuem.

As salinas são áreas de produção de sal marinho através da evaporação da água do mar. Em Aveiro (Figura 9), as salinas ocupam áreas de sapal, estando a maioria localizadas em ilhas, devido à instabilidade da barra (isolamento em relação ao mar). As salinas são preparadas em março, quando começa a época da safra, decorrendo depois a extração do sal durante os meses de julho a outubro (90).



Figura 9 - Salinas de Aveiro.

As salinas podem estar localizadas em áreas geográficas com diferentes características ambientais. Tanto estão presentes em estuários, isto é, zonas de transição entre rio e mar, com uma extensa fauna e flora (91), como também podem estar localizadas em zonas perto do mar ou à beira-mar, zonas essas que podem ser áridas ou com vegetação. O meio

ambiente desses sistemas consiste então na água do mar que abastece as salinas, os organismos halófitos, ou seja organismos que sobrevivem em condições extremas de salinidade como algas, microalgas, invertebrados marinhos ou bactérias, a vegetação que está ao redor das salinas e a atmosfera (88). Assim, dependendo da composição deste ecossistema tem-se diferentes tipos de composição da matéria orgânica destas águas, uma vez que através de lise celular, apoptose ou exsudação de, por exemplo, algas ocorre a libertação de compostos orgânicos, tais como os polissacarídeos sulfatados, para a água das salinas, tornando-se assim numa potencial fonte de extração deste tipo de compostos (92).

Relativamente à água das salinas de Aveiro já foram realizadas análises de composição em hidratos de carbono, verificando-se que os polissacarídeos predominantes são derivados das fucoidanas e ulvanas (89). Este material polimérico obtido da água das salinas revelou ter potencial imunoestimulador. O sal produzido nestas salinas também foi estudado (88,93), sendo constituído por resíduos de ácidos urónicos (20%mol), glucose (17%mol), galactose (15%mol), fucose (12 %mol), xilose (9%mol), manose (9%mol), ramnose (8%mol), arabinose (5%mol) e ribose (1%mol) (93), podendo os resíduos de fucose e de galactose estar sulfatados (88). Contudo, as características estruturais dos polissacarídeos presentes nesta água ainda não estão completamente esclarecidas devido à elevada complexidade apresentada pelas amostras. Assim, é necessária a utilização de processos de purificação a fim de se determinar de uma forma detalhada a estrutura dos polissacarídeos sulfatados presentes nas águas das salinas e das suas propriedades biológicas.

1.3. Objetivos

Os polissacarídeos sulfatados presentes na água do mar poderão ter um elevado valor comercial, nomeadamente na indústria alimentar e farmacêutica. Uma possível fonte rica nestes polissacarídeos é a água das salinas, uma vez que estes compostos, muito solúveis em água, são concentrados por evaporação. Desta forma, a água das salinas torna-se uma fonte viável para a extração de polissacarídeos sulfatados, como verificado em estudos recentes (88,89).

Este trabalho tem como objetivo a purificação e caracterização estrutural dos polissacarídeos presentes nas águas das salinas de Aveiro. O seu potencial biológico foi

também avaliado por determinação das atividades imunoestimuladora e antioxidante com vista a uma aplicação na área alimentar ou biomédica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação das amostras

Neste trabalho foram analisadas duas amostras de águas das salinas. As amostras foram recolhidas em 2013, sendo que a recolha da amostra de água das salinas A (AS-A) foi realizada setembro (ainda durante a época de safra do sal), enquanto que a da amostra de água das salinas B (AS-B) foi realizada em outubro (após a época de recolha do sal). A amostra AS-A foi armazenada num tanque de recolha, tendo-se verificado que após os 2 anos de armazenamento existia material depositado no fundo. Assim foram também recolhidas duas amostras desse material precipitado, nomeadamente a água que se encontrava no fundo do tanque (AS-FT) e um material com consistência mais viscosa que se designou por gel do fundo do tanque (GS-FT).

As amostras AS-A, AS-FT e GS-FT foram dialisadas contra água destilada de forma a ser possível recolher o material de alto peso molecular. Para isso colocaram-se 5 mangas de diálise (Medicell, 12-14 kDa), cada uma com 100 mL de água das salinas, num pote com 10 litros de água destilada. A diálise ficou concluída quando a condutividade do dialisado atingiu a condutividade da água destilada, o que aconteceu passados 4 dias (com 2 trocas de água por dia). Para assegurar que todo o sal foi removido da amostra, concentrou-se a amostra e voltou-se a dialisar, também durante 4 dias. De seguida, a amostra foi congelada, liofilizada e armazenada num exsiccador. A amostra AS-B foi ultrafiltrada usando uma membrana com um *cut-off* de 10 kDa e depois congelada e liofilizada.

2.2. Purificação e análise das amostras

Tendo em conta que as amostras iniciais de água das salinas são matrizes bastante complexas, foram realizados alguns passos de purificação de forma a ser possível a separação de compostos com diferentes características. As amostras sujeitas a estes passos de purificação foram a AS-A e a AS-B.

2.2.1 Cromatografia de troca aniónica

Foi realizada uma cromatografia de troca aniónica com o objetivo de se conseguir separar frações com diferentes cargas. Para tal foi utilizada uma coluna de cromatografia

DEAE-Trisacryl M (Sigma), com 26 mL de volume, e uma solução tampão Tris-HCl 50 mM a pH=7,4.

Foram colocadas na coluna cerca de 100 mg de amostra, dissolvida em 100 mL de solução tampão. De seguida a amostra foi eluída com soluções de NaCl em Tris-HCl 50 mM com força iónica crescente, nomeadamente só com solução tampão, NaCl 0,125 M; 0,25 M; 0,5 M; 1M e 2M. Para cada eluente foram recolhidas 20 frações com 3,98 mL (velocidade 0,398 mL/min), perfazendo um total de 120 frações. O perfil cromatográfico foi obtido pela realização do método de Dubois (descrito no ponto 2.2.3) a cada fração, sendo assim possível identificar as frações contendo açúcares. Estas frações foram então agrupadas, de acordo com o eluente com que foram eluídas da coluna, sendo de seguida dialisadas contra água destilada, congeladas e liofilizadas. Após a liofilização, foram realizadas as análises de açúcares neutros, determinação do teor de sulfatos e determinação de ácidos urónicos, descritas nos pontos 2.4, 2.5 e 2.6, respetivamente.

2.2.2 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada à amostra AS-A_inicial e às frações AS-A_NaCl 0,125M; 0,25 M e 0,5 M obtidas na cromatografia de troca iónica, de forma a ser possível obter populações de polissacarídeos com diferentes pesos moleculares. Assim, foi utilizada uma coluna de cromatografia de 100 cm x 1,6 cm com gel Sephacryl S-300, cuja gama de fracionamento de dextranas é de 2 a 400 kDa. A solução tampão utilizada foi fosfato de sódio 100 mM a pH = 7,4 com ureia 3M. A calibração foi realizada com dextrana azul, para determinação do volume de exclusão, e com glucose, para determinação do volume de inclusão.

Colocou-se na coluna 1 mL de amostra e eluiu-se com 200 mL de solução tampão, recolhendo-se um volume morto de 76 mL e 130 frações de 1,0 mL, sendo a velocidade de eluição 0,51 mL/min. O perfil cromatográfico das amostras foi obtido através da análise das frações pelo método de Dubois (descrito em 2.2.3), de forma a ser possível detetar onde estavam presentes os açúcares, e pela medição da absorvância a 280 nm, com o objetivo de detetar a presença de proteína ou compostos fenólicos. Após a obtenção do perfil cromatográfico da amostra, as frações foram divididas em 4 grupos, sendo de seguida dialisados e liofilizados. As frações liofilizadas foram de seguida caracterizadas

através da realização de análise de açúcares neutros e determinação de ácidos urónicos, descritas nos pontos 2.4 e 2.5.

2.2.3 Método de Dubois

Para identificação das frações contendo açúcares obtidas por cromatografia foi realizado o método de Dubois (94). Num tubo de ensaio adicionou-se 80 µL de amostra e 150 µL de fenol 5%. De seguida adicionou-se de uma só vez, não deixando escorrer pelas paredes do tubo, 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Incubaram-se todos os tubos a 100 °C durante 10 min. Depois de se deixar arrefecer, transferiu-se 300 µL das soluções para uma microplaca de forma a ler a absorvância a 490 nm, recorrendo a um leitor de microplacas Biotek Eon.

2.3. Hidrólise enzimática com proteases

A amostra inicial foi sujeita a uma hidrólise enzimática com proteases com o objetivo de comparar o perfil obtido inicialmente por cromatografia de exclusão molecular com o perfil da amostra hidrolisada. Assim, a amostra AS-B foi solubilizada em 2 mL de solução tampão fosfato 50 mM a pH 7,0, contendo 0,05% (w/v) azida de sódio e 1% (w/w) Pronase, tendo sido de seguida incubada a 37 °C durante 24 h. No fim desse período foram adicionadas 10 µg de Prolidase à solução e incubou-se novamente a 37 °C durante 2 h. A mistura obtida foi seca no *speedvac*, tendo sido de seguida diluída em 1 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM a pH = 7,4 com ureia 3M, e colocada na coluna de exclusão molecular.

2.4. Análise de açúcares neutros com hidrólise redutiva

A análise de açúcares neutros foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Stevenson *et al.* (95), uma vez que através deste método é possível impedir a degradação de alguns resíduos de açúcares, nomeadamente o resíduo de 3,6-anidro-D-galactose, que normalmente ocorre durante hidrólise ácida. Assim, este protocolo permite que os polissacarídeos sejam hidrolisados e os respetivos resíduos de açúcares sejam reduzidos

simultaneamente. De seguida estes resíduos são convertidos em acetatos de alditol, através de uma reação de acetilação, de forma a ser possível a sua análise por GC-FID.

Pesou-se cerca de 1 mg de amostra para tubos *speedvac* e dissolveu-se a amostra em 200 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) 3M e adicionou-se 50 μ L do complexo borano-4-metilmorfolina (MMB) 80 mg/mL. De seguida os tubos foram colocados a 80 °C durante 5 min, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e foram adicionados mais 50 μ L de MMB. As amostras foram então incubadas a 120 °C durante 1 hora, deixando-se depois arrefecer até atingir a temperatura ambiente. Foram então adicionados mais 100 μ L de MMB e 100 μ L de padrão interno (2-desoxiglucose 1 mg/mL). De seguida evaporou-se todo o TFA no *speedvac*, dissolvendo-se o resíduo resultante em 100 μ L de ácido acético glacial. As amostras foram então colocadas num banho de gelo e adicionou-se 450 μ L de 1-metilimidazol e, muito lentamente, 3 mL de anidrido acético. Agitou-se bem e as amostras foram incubadas a 30 °C durante 30 min, sendo de seguida colocadas num banho de gelo. Adicionou-se 3 mL de água destilada (para decompor o anidrido acético em excesso) e 2,5 mL de diclorometano para se extrair os acetatos de alditol. Esta mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 30 s e de seguida removeu-se a fase aquosa. Repetiu-se o passo anterior mais uma vez e de seguida lavou-se a fase orgânica duas vezes com 3 mL de água destilada, sendo a mistura novamente agitada, centrifugada e tendo-se removido totalmente a fase aquosa. De seguida o diclorometano foi evaporado no *speedvac*, tendo sido adicionado de seguida 1 mL de acetona anidra e secando-se a amostra novamente.

Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 50 μ L de acetona anidra e analisados por cromatografia em fase gasosa usando o Cromatógrafo Perkin Elmer-Clarus 400 com um detetor de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna capilar DB-225 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 μ m de espessura de filme. Injetou-se 2 μ L de amostra com a temperatura do injetor a 220 °C e a temperatura do detetor a 230 °C, com um split de 10 min. O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: temperatura inicial de 200 °C, aumentando de seguida para 220 °C a 40 °C/min e mantendo esta temperatura durante 7 min; após esse período, a temperatura aumenta até 230 °C a 20 °C/min, mantendo esta temperatura durante 1 min.

Os tempos de retenção dos acetatos de alditol presentes na amostra foram comparados com os tempos de retenção de padrões possibilitando a identificação dos resíduos de açúcares presentes na amostra. Relativamente à quantificação destes açúcares,

verifica-se que existe uma relação linear entre a área do pico obtido e a concentração do respectivo açúcar, sendo o fator de resposta 1.

2.5. Determinação de ésteres de sulfato por turbidimetria

A determinação da concentração de ésteres de sulfato nas amostras AS-A e AS-B foi realizada com base no protocolo proposto por Dodgson *et al.* (96). O reagente gelatina – cloreto de bário foi preparado por dissolução de 1 g de gelatina em 200 mL de H₂O quente, seguindo-se um período mínimo de repouso de 6 h a 4 °C. Após este período dividiu-se a gelatina em duas partes de 100 mL e dissolveram-se 0,5 g de cloreto de bário a uma das partes, deixando-se repousar durante 2 a 3 h.

Pesaram-se 4 mg de amostra que se dissolveram em 1 mL de HCl 1 M e colocou-se num bloco de aquecimento a 105-110 °C durante 5 h, de forma a hidrolisar os ésteres de sulfato. Arrefeceu-se a mistura e transferiram-se 0,2 mL do hidrolisado, em duplicado, para tubos sovirel contendo 3,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) 3% (m/v). De seguida adicionou-se 1 mL do reagente gelatina – cloreto de bário, deixando-se sob agitação durante 20 min. Após o período de agitação leu-se a absorvância a 360 nm no leitor de microplacas, tendo sido utilizado como branco uma amostra à qual foi substituída a alíquota de amostra por água destilada. O valor obtido quando se adicionou a amostra à solução contendo apenas gelatina foi subtraído ao valor obtido para a amostra com gelatina – cloreto de bário.

A concentração de ésteres de sulfato foi determinada através da construção de uma curva de calibração de K₂SO₄, contendo entre 20 e 200 µg do ião SO₄²⁻.

2.6. Análise de ácidos urónicos

A análise de ácidos urónicos foi realizada através do método colorimétrico descrito por Coimbra *et al.* (97). Pesou-se cerca de 2 mg de amostra para tubos de cultura e realizou-se uma pré-hidrólise da amostra por adição de 200 µL de H₂SO₄ 72%, deixando-se reagir à temperatura ambiente durante 3 h (agitando-se os tubos duas a três vezes durante este período). De seguida foram adicionados 2,2 mL de água destilada a cada tubo, obtendo-se uma concentração de 1M de H₂SO₄, incubando-se os tubos a 100 °C durante 1 h. De seguida, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e foi retirada uma

alíquota de 0,5 mL de hidrolisado para um porta-amostras, à qual foram adicionados 3 mL de água destilada.

Dado que a determinação de ácidos urónicos é feita através de um método colorimétrico é necessário realizar uma curva de calibração. Para tal foram preparados padrões com concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µg/mL de ácido galacturónico (a partir de uma solução-mãe com concentração de 200 µg/mL). Para cada solução padrão ou amostra foram preparados 3 tubos de ensaio (1 branco e 2 réplicas) com 0,5 mL de solução. Todos os tubos de ensaio foram colocados num banho de gelo e adicionaram-se 3 mL de 50 mM de borato de sódio preparado em ácido sulfúrico concentrado. De seguida os tubos foram muito bem agitados, tapados com folha de alumínio e colocados num banho a 100 °C durante 10 min. No fim desse período adicionou-se, no escuro, 100 µL de m-fenilfenol (MFF) 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH a 2 dos 3 tubos de cada amostra e padrão. O tubo ao qual não foi adicionado MFF é o branco de cada amostra ou padrão. Os tubos foram novamente muito bem agitados e deixaram-se a reagir no escuro durante 30 min. No fim desse período agitou-se os tubos mais uma vez de forma a que as soluções ficassem homogêneas e colocou-se 300 µL de amostra nos poços de uma microplaca de plástico, lendo-se depois a absorvância a 520 nm recorrendo a um leitor de microplacas Biotek Eon.

2.7. Análise de metilação

Após a análise de açúcares neutros, foram analisadas as ligações glicosídicas presentes na amostra. Para tal fez-se uma análise de metilação, que se baseia em metilar os grupos hidroxilo livres e, após hidrólise das ligações glicosídicas, acetilar os hidroxilos que ficaram livres (98).

Pesou-se cerca de 1 mg de amostra, previamente seca sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo (P₂O₅) *overnight*, para um tubo próprio para o *speedvac*, adicionou-se 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (seco com peneiros moleculares 3 Å) e deixou-se em agitação durante a noite para a dissolução completa da amostra. De seguida, trituraram-se algumas lentilhas de NaOH num almofariz, sob atmosfera com corrente de argon, até se obter um pó fino, adicionando-se cerca de 40 mg a cada tubo. Deixou-se a reagir durante 30 min à temperatura ambiente com agitação contínua. Seguidamente, adicionou-se 80 µL de iodeto de metilo com uma seringa e deixou-se reagir durante 20

min com agitação vigorosa. Após este período, repetiu-se a adição de 80 μL de CH_3I mais duas vezes, deixando-se reagir novamente durante 20 min. De seguida as amostras foram dissolvidas em 3 mL de uma solução de clorofórmio e metanol ($\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$, 1:1, v/v) e dialisou-se contra uma solução de 50% etanol:água ($\text{EtOH:H}_2\text{O}$), mudando-se a solução 3 vezes. Seguidamente as amostras foram concentradas até à secura, sendo novamente diluídas em DMSO e repetindo-se os passos anteriores de forma a garantir a metilação completa da amostra.

Após a metilação da amostra, adicionou-se 500 μL de TFA 2 M a cada um dos tubos e incubou-se a 121 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h, agitando-se os tubos 2 a 3 vezes durante esse período. De seguida, o TFA foi evaporado no *speedvac* e ao resíduo resultante foram adicionados 300 μL de NH_3 2M e 20 mg de NaBD_4 , deixando-se reagir durante 1 h a 30 $^{\circ}\text{C}$. Arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se duas vezes 50 μL de ácido acético glacial para eliminar o excesso de BD_4^- .

Para a reação de acetilação ocorrer adicionou-se 450 μL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético. Agitou-se bem e incubou-se num bloco de aquecimento a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. De seguida, com os tubos num banho de gelo, adicionou-se 3,0 mL de água destilada, para decompor o excesso de anidrido acético, e 2,5 mL de diclorometano. Agitou-se vigorosamente os tubos, para extrair os acetatos de alditol, e centrifugou-se cerca de 30 s a 3000 rpm para se obter a separação das duas fases. Aspirou-se então a fase aquosa por sucção e repetiu-se a adição de água destilada e de diclorometano. Agitou-se, centrifugou-se e removeu-se totalmente a fase aquosa de todos os tubos como descrito anteriormente. Lavou-se bem a fase orgânica mais duas vezes, cada uma delas com 3,0 mL de água destilada, repetindo-se o processo de agitar, centrifugar e remover a fase aquosa. Evaporou-se o diclorometano no *speedvac*, adicionando-se de seguida 1,0 mL de acetona anidra, que também foi evaporada no *speedvac*. Repetiu-se este procedimento mais uma vez, adicionando-se mais 1,0 mL de acetona anidra e evaporando no *speedvac*.

Os acetatos de alditol parcialmente metilados foram dissolvidos em 50 μL de acetona anidra e analisados por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massa, utilizando um GC-MS-QP 2010 Plus Shimadzu, equipado com uma coluna capilar DB-1 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 μm de espessura. Foram injetados 0,2 μL de amostra com a temperatura de injetor a 250 $^{\circ}\text{C}$, e temperatura do detetor a 300 $^{\circ}\text{C}$. O programa de temperaturas tem início aos 80 $^{\circ}\text{C}$, com incrementos de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até aos 140 $^{\circ}\text{C}$, mantendo-se nesta temperatura durante 5 min. De seguida sobe 0,2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

até aos 151,8 °C, passando então a ter incrementos de 60 °C/min até 250 °C, onde permanece durante 2 min, sendo o tempo total da análise de 62 minutos. Relativamente ao espectrómetro de massa, a energia de ionização é -70 eV, a temperatura da fonte de ionização é de 250 °C e a de interface é 300 °C, detetando relações m/z entre 50,00 e 700,00.

2.7.1 Dessulfatação

De forma a ser possível determinar os locais de ligação nos resíduos de açúcar dos grupos sulfato procedeu-se a uma dessulfatação com ácido piromelítico (99). Pesou-se 10 mg de amostra para um tubo *speedvac* e adicionou-se 1,8 mL de DMSO, 100 µL de piridina, 13 mg de ácido benzeno-1,2,4,5-tetracarboxílico (ácido piromelítico), 12 mg de fluoreto de sódio e 200 µL de piridina. Colocou-se a amostra a 120 °C durante 3 h, deixando-se depois arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida adicionou-se 1 mL de hidrogenocarbonato de sódio 3%. A solução foi dialisada contra água destilada, sendo de seguida liofilizada. As amostras dessulfatadas foram metiladas, como descrito no ponto 2.6, de forma a ser possível a identificação dos locais de ligação dos ésteres de sulfato por comparação com a análise de metilação das amostras iniciais.

2.8. Análise elementar

O teor em sulfatos e o teor em proteína das amostras foi determinado por análise elementar por combustão recorrendo ao equipamento Truspec 630-200-200 com detetor de condutividade térmica. Para a determinação do teor de proteína foi considerado o fator de Kjeldahl de 6,25 multiplicando-se pelo teor de azoto obtido na análise elementar.

2.9. Avaliação da atividade imunoestimuladora

A avaliação da atividade imunoestimuladora foi realizada com base no protocolo descrito por Passos et al. (100). Os linfócitos foram obtidos por remoção do baço de ratos BALB/c, colocado em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), constituído por aminoácidos e vitaminas num sistema tampão de hidrogenocarbonato,

suplementado com penicilina (100 IU/mL), estreptomicina (50 mg/L), 2-mercaptoetanol (0,05 mol/L), 10% de soro fetal bovino e L-glutamina (4 mmol/L), seguindo-se a suspensão mecânica das células. De seguida, as células foram incubadas numa placa de 96 poços, sendo que cada poço continha 10^6 células, juntamente com 50 μ L de solução aquosa da amostra com as diferentes concentrações (para as amostras iniciais e para as frações obtidas por troca iónica utilizaram-se as concentrações 25, 50 e 75 μ g de polissacarídeo/mL, e para as frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular utilizaram-se 10, 15 e 20 μ g de polissacarídeo/mL) e 50 μ L de RPMI. Foram também realizados dois controlos, sendo o controlo negativo realizado através da adição de 100 μ L de RPMI e o controlo positivo com a adição de 4 μ L de lipopolissacarídeo (LPS) da *Salmonella abortus equi* ou de de Concanavalina A 50 μ g/mL e 96 μ L de RPMI. As placas foram de seguida incubadas a 37 °C durante 6 h, numa atmosfera contendo 95% de humidade e 5% de CO₂.

Após este período as células foram incubadas durante 30 min com os anticorpos específicos anti-CD3-PE e anti-CD19-FITC para marcar as células T e B, respetivamente. Para avaliar a ativação das células usou-se o anticorpo anti-CD69-PE-Cy7, que é um marcador de ativação precoce. Após a incubação com os anticorpos, adicionou-se tampão PBS diluído contendo azida de sódio e albumina sérica bovina (BSA), de forma a retirar o excesso de anticorpos. Centrifugaram-se e ressuspenderam-se as células em tampão de PBS/BSA/azida contendo iodeto de propídio que funciona como um marcador de viabilidade, permitindo identificar e excluir as células mortas. Por fim, as células foram analisadas por citometria de fluxo (EPICS XL Beckman Coulter, com o software FlowJo).

2.10. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de ABTS (101). Em primeiro lugar, preparou-se uma solução 7 mM de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)), pesando-se 19,2 mg e adicionando-se a 5 mL de solução de persulfato de potássio (esta solução foi preparada na hora, tendo sido adicionadas 3,31 mg de K₂S₂O₈ a 5,0 mL de água). A solução de ABTS foi deixada a reagir no escuro durante cerca de 16 h para formação do radical. De seguida, diluiu-se 1 mL da solução de ABTS em 80 mL de água destilada.

Preparou-se uma solução-mãe de Trolox com 400 μM , de forma a ser realizada uma curva de calibração. Prepararam-se então as diluições adequadas para obter cinco soluções de Trolox (50, 100, 200, 300 e 400 μM).

Numa microplaca adicionou-se a cada poço 50 μL de amostra ou solução de Trolox e 250 μL de $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Colocou-se a microplaca no leitor, agitou-se e deixou-se reagir no escuro durante 15 min a 25 °C. De seguida leu-se a absorvância a 734 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das amostras de água da Ria de Aveiro

A amostra de água das salinas AS-A demonstrou possuir 369 mg/L de material polimérico. Este rendimento está de acordo com o descrito num trabalho anterior (89) em que diferentes amostras de água das salinas tiveram rendimentos entre 121 e 613 mg/L. As amostras recolhidas do fundo do tanque de armazenamento apresentaram um rendimento muito superior ao da amostra AS-A, nomeadamente 1,810 g de material polimérico/L para a amostra AS-FT e 2,350 g de material polimérico/L para a amostra GS-FT. Dado que estas duas amostras são de material que se encontrava precipitado seria de esperar a obtenção de um rendimento superior relativamente ao material polimérico que se encontra dissolvido na água.

Relativamente à composição do material polimérico das amostras iniciais, apresentada na tabela 1, verifica-se que o componente maioritário são os açúcares (40% para AS-A, 45% para AS-B, 32% para AS-FT e 35% para GS-FT), estando de acordo com a literatura (89), seguidos pela proteína (17% para AS-A, AS-FT e GS-FT e 11% para AS-B) e, por último, pelos ésteres de sulfato com 3% para todas as amostras. Apesar de se ter obtido um maior rendimento de material polimérico para as amostras obtidas do fundo do tanque de recolha verifica-se que contêm uma quantidade relativamente menor de açúcares na sua composição. Provavelmente este material depositado contém maior quantidade de material inorgânico do que o que se encontra solúvel nas amostras de água de superfície.

Os valores obtidos para a composição em ésteres de sulfatos encontram-se um pouco abaixo do que já se encontra descrito para o mesmo tipo de amostra, entre 51 e 103 µg/mg (89). Contudo é necessário ter em conta que a composição em ésteres de sulfatos que se encontra descrita na literatura foi determinada por turbidimetria enquanto que os valores apresentados na tabela 1 foram determinados por análise elementar. A quantidade de ésteres de sulfatos das amostras AS-A e AS-B foi também determinada por turbidimetria, para comparação com a bibliografia, tendo-se obtido 88 µg/mg para a amostra AS-A e 78 µg/mg para a amostra AS-B, estando portanto de acordo com a literatura. Existem fatores que podem influenciar a determinação dos sulfatos por turbidimetria, nomeadamente outros compostos presentes na amostra, que podem estar a sobrevalorizar o conteúdo determinado por esta metodologia.

Tabela 1 – Composição (µg/mg) do material polimérico das amostras iniciais.

Composição (µg/mg)				
	Total açúcares	Ésteres de sulfato	Proteína	Total
AS_A - inicial	396	35	166	597
AS_B - inicial	450	37	105	592
AS-FT	315	30	171	516
GS-FT	353	33	176	562

A análise de açúcares neutros e a determinação do teor em ácidos urónicos revelou uma composição em monossacarídeos semelhante em todas as amostras de água das salinas (Tabela 2). Os resíduos maioritários são os ácidos urónicos com uma concentração de 150 µg/mg na amostra AS-A e 206 µg/mg na amostra AS-B, 140 µg/mg na amostra AS-FT e 172 µg/mg na amostra GS-FT, o que corresponde a percentagens molares que variam entre 35% e 45%, estando de acordo com a literatura (89). Os resíduos maioritários são os ácidos urónicos o que está relacionado com o facto destes polissacarídeos serem bastante solúveis em meios aquosos por estarem carregados negativamente.

Relativamente aos açúcares neutros, os resíduos principais em ambas as amostras de água de superfície são a galactose (10-13%mol), a glucose (8-11%mol), a fucose (10%mol), a xilose (9%mol) e a ramnose (7-9%mol). O resíduo de arabinose está presente em maior quantidade na amostra AS-B (8%) do que na amostra AS-A (4%), enquanto o inverso ocorre com o resíduo de manose (8% na amostra AS-A e 5% na amostra AS-B). As amostras do fundo do tanque, AS-FT e GS-FT, têm uma composição em açúcares muito semelhante e idêntica à composição das amostras de água de superfície, uma vez que os resíduos neutros maioritários continuam a ser a glucose, a galactose e a fucose, seguidos pelos resíduos de xilose, manose, ramnose e arabinose.

Tabela 2 – Composição em monossacarídeos (% molar) das amostras de água da Ria de Aveiro.

Composição em Açúcares (%mol)										Total açúcares (mg/g)
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	HexA	
AS_A - inicial	9	10	1	4	9	8	13	11	35	396
AS_B - inicial	7	10	1	8	9	5	10	8	42	450
AS-FT	8	11	0	3	8	7	10	12	41	315
GS-FT	7	10	0	3	7	6	10	11	45	353

Os resultados obtidos com esta análise de açúcares permitem concluir que existe uma grande diversidade de açúcares que constituem os polissacarídeos da água das salinas, uma vez que estão presentes todos os monossacarídeos característicos dos vários polissacarídeos sulfatados existentes em ambientes marinhos, com exceção do resíduo 3,6-anidro-galactose que não foi identificado em nenhuma das amostras (figura 10). Assim, é possível afirmar que estas amostras de polissacarídeos da água das salinas de Aveiro não são constituídas por um só tipo de polissacarídeo, mas pela mistura de vários polissacarídeos existentes no meio. Também é possível concluir que a composição destes polissacarídeos não varia de acordo com a altura em que foram recolhidos, uma vez que as amostras AS-A e AS-B têm uma composição semelhante.

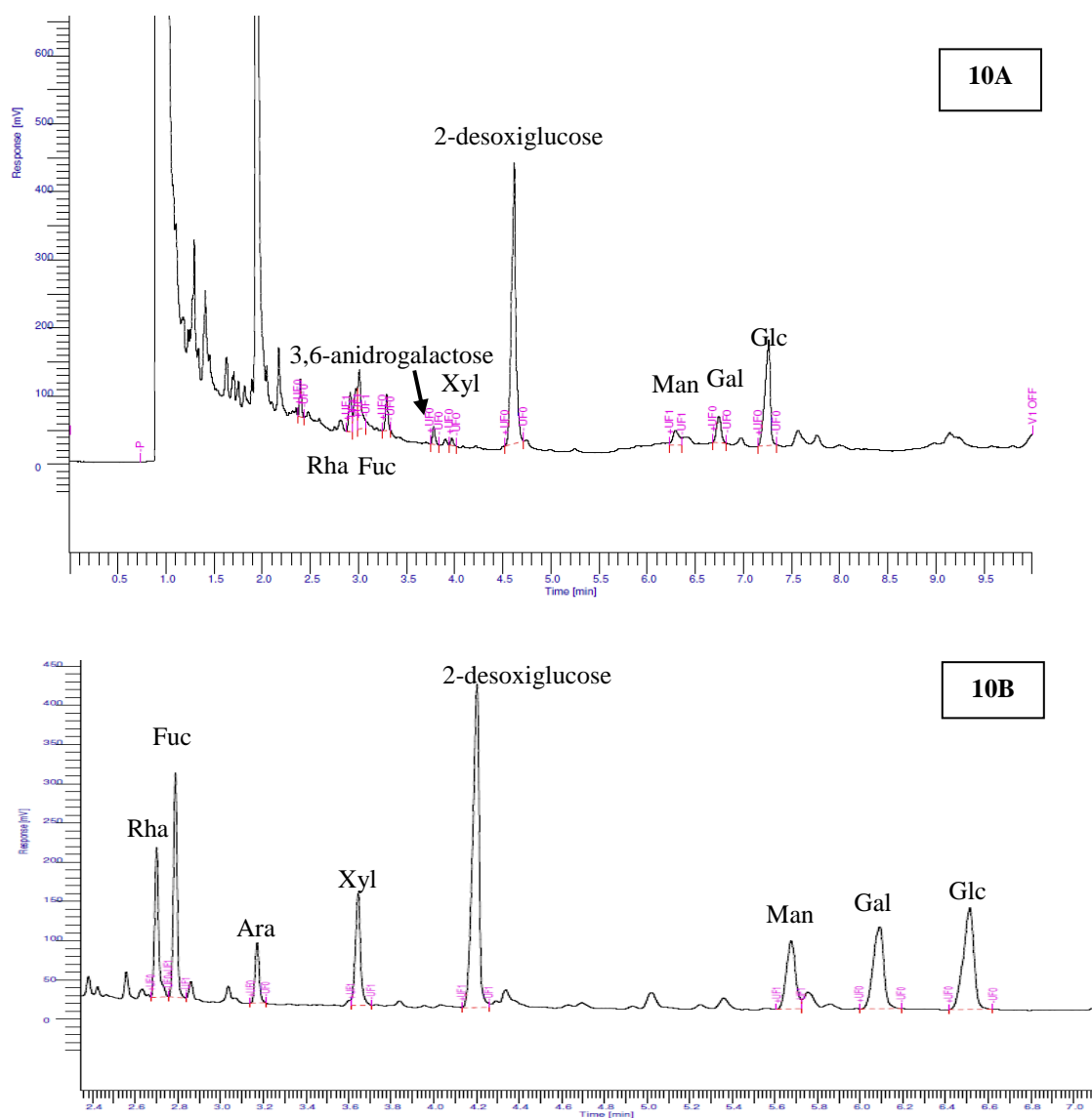


Figura 10 - Cromatogramas obtidos por GC-FID. 10A: exemplo de um cromatograma com o resíduo 3,6-anidrogallactose; 10 B: cromatograma obtido na análise da amostra AS-FT (sem 3,6-anidrogallactose).

A análise de açúcares por metilação realizada às amostras de água permite identificar as ligações glicosídicas presentes na amostra, sendo possível verificar a presença de ligações características de determinados tipos de polissacarídeos. A realização desta análise após a dessulfatação da amostra permite também a identificação dos locais de ligação dos ésteres de sulfato, por comparação às ligações presentes na amostra sulfatada.

Na tabela 3 encontram-se os resíduos que foram identificados para cada uma das amostras de água e também para a amostra AS-B dessulfatada (AS-B_DS). Todas as ligações identificadas foram descritas para a água das salinas e para o sal (88,89), com a exceção de dois resíduos, nomeadamente 2,4-Fuc e 2,3,4-Gal. Comparando as quatro amostras verifica-se que foram encontrados o mesmo tipo de resíduos, praticamente nas mesmas proporções, o que significa que as amostras possuem o mesmo tipo de polissacarídeos, como era esperado tendo em conta os resultados muito semelhantes obtidos na análise de açúcares neutros.

Tendo em consideração que estes polissacarídeos são de origem marinha é possível identificar algumas ligações características de, por exemplo, fucoidanas, carragenanas ou ulvanas. No caso da fucose, foram identificados nas amostras resíduos em ligação (1→3) pertencente à cadeia principal e resíduos que apresentam substituições no carbono 2 e/ou no carbono 4, resíduos de 2,3-Fuc, 3,4-Fuc e 2,3,4-Fuc, sendo estes resíduos característicos de polissacarídeos como as fucoidanas, uma vez que os ésteres de sulfatos estão habitualmente ligados nessas posições (102). Relativamente à galactose foram identificados resíduos em ligação (1→4) e resíduos que para além dessa ligação apresentam também substituições no carbono 2, 3 e 6, resíduos de 2,3,4-Gal, 3,4,6-Gal, e 2,3,4,6-Gal, sendo estes resíduos característicos das carragenanas, uma vez que os ésteres de sulfatos podem estar ligados em qualquer um desses carbonos (103). Os resíduos de ramnose em ligação (1→3) e de xilose em ligação (1→4), bem como as substituições no carbono 2 e 3, resíduos de 2,4-Rha, 2,3,4-Rha e 3,4-Xyl de ambos os resíduos são tipos de ligações característicos das ulvanas (104). Relativamente à glucose, encontra-se descrita a presença de resíduos de T-Glc em polissacarídeos provenientes da alga castanha *Sargassum fusiforme* (105) e a presença de resíduos 1,4-Glc e 1,4,6-Glc em glucanas produzidas pela alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (106), estando também descrito que esta alga produz glucomananos contendo resíduos de T-Man.

Comparando a amostra AS-B_inicial com a amostra AS-B_DS, verificamos que é possível identificar os locais de ligação dos grupos sulfato. No caso da arabinose observa-

se que na amostra dessulfatada sofre uma diminuição da quantidade de ramificações no carbono 3 e no carbono 5, uma vez que os resíduos 2,4-Ara e 2,3,5-Ara deixam de ser identificado e há uma diminuição da quantidade dos resíduos 2,5-Ara e 3,5-Ara, ao mesmo tempo que tanto a quantidade do resíduo 2-Ara e T-Ara aumenta. Relativamente aos resíduos de xilose não se verificam alterações na quantidade relativa dos diferentes derivados concluindo-se que não existem sulfatos ligados a este monossacarídeo. No caso da ramnose é possível observar uma diminuição da quantidade de ramificações no carbono 2 e no carbono 4, resíduo 2,3,4-Rha, ocorrendo um aumento da quantidade do resíduo T-Rha, 2-Rha e 3-Rha, levando a concluir a presença de sulfatos ligados ao carbono 4. Quanto à fucose verifica-se a diminuição do resíduo 2,3,4-Fuc e o aumento do resíduo T-Fuc, 3-Fuc e 3,4-Fuc, o que permite identificar a presença de grupos sulfato no carbono 2. Na galactose verifica-se que os resíduos 2,6-Gal, 3,4,6-Gal e 2,3,6-Gal não são identificados na amostra dessulfatada e que o resíduo 2,3,4,6-Gal sofre uma diminuição, enquanto a quantidade dos resíduos T-Gal, 2-Gal e 2,3-Gal aumenta, levando a concluir que existem ésteres de sulfato ligados ao carbono 6 e possivelmente também ao carbono 2 deste monossacarídeo.

Tabela 3 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados das amostras de água sulfatadas e dessulfatada.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AS-FT	GS-FT	AS-A_inicial	AS-B_inicial	AS-B_DS
2,3,5-Me ₃ Ara	T-Ara	0,8	0,6	0,4	0,4	0,6
3,5-Me ₂ Ara	2-Ara	0,1	-	0,3	1,1	3,0
2,5-Me ₂ Ara	3-Ara	0,1	-	0,2	0,6	0,9
2,3-Me ₂ Ara	5-Ara	0,8	0,8	0,5	1,1	0,6
2-Me Ara	3,5-Ara	0,4	0,4	0,5	1,0	0,3
3,5-Me ₂ Ara	2,4-Ara	2,1	1,9	1,4	2,3	-
3-Me Ara	2,5-Ara	0,8	0,8	0,7	2,9	1,0
4-Me Ara	2,3,5-Ara	1,5	1,7	2,2	4,5	-
	Total	6,5	6,1	6,2	13,9	6,4
2,3,4-Me ₃ Xyl	T-Xyl	6,0	6,2	3,0	4,3	4,6
3,4-Me ₂ Xyl	2-Xyl	2,7	2,5	1,7	2,4	1,8
2,4-Me ₂ Xyl	3-Xyl	1,3	1,1	0,5	1,1	0,6
2,3-Me ₂ Xyl	4-Xyl	3,2	3,0	2,0	2,8	2,1
2-Me Xyl	3,4-Xyl	0,9	0,9	1,0	0,7	1,7
	Total	14,1	13,6	8,2	11,2	10,8
2,3,4-Me ₃ Rha	T-Rha	2,2	2,5	1,0	0,9	2,1
3,4-Me ₂ Rha	2-Rha	3,7	4,9	2,9	3,3	4,7
2,4-Me ₂ Rha	3-Rha	1,4	1,6	0,9	0,7	2,5
3-Me Rha	2,4-Rha	0,8	0,7	0,7	1,1	1,2
Rha	2,3,4-Rha	1,2	0,7	3,5	3,8	2,7
	Total	9,4	10,3	9,1	9,8	13,2
2,3,4-Me ₃ Fuc	T-Fuc	2,3	2,3	1,5	1,3	2,7
2,4-Me ₂ Fuc	3-Fuc	1,4	1,2	1,1	0,9	1,9
2-Me Fuc	3,4-Fuc	5,6	6,8	5,3	3,3	6,8
4-Me Fuc	2,3-Fuc	1,1	1,0	1,4	0,8	1,8
3-Me Fuc	2,4-Fuc	0,2	-	-	-	-
Fuc	2,3,4-Fuc	7,1	7,1	8,4	8,9	7,6
	Total	17,7	18,3	17,7	15,1	20,9
2,3,4,6-Me ₄ Glc	T-Glc	5,3	6,1	2,6	2,9	4,9
2,3,6-Me ₃ Glc	4-Glc	8,4	11,7	14,4	3,9	9,0
2,3,4-Me ₃ Glc	6-Glc	0,4	-	-	-	-
4,6-Me ₂ Glc	2,3-Glc	1,7	1,5	0,9	0,8	1,1
2,3-Me ₂ Glc	4,6-Glc	1,1	1,0	0,7	0,6	0,5
2,4-Me ₂ Glc	3,6-Glc	0,7	0,5	0,2	0,7	-
6-Me Glc	2,3,4-Glc	0,9	0,7	0,9	0,9	0,8
2-Me Glc	3,4,6-Glc	1,0	0,8	0,9	1,4	1,3
4-Me Glc	2,3,6-Glc	-	0,9	1,0	1,6	-
Glc	2,3,4,6-Glc	2,5	1,7	4,9	7,3	1,8
	Total	16,7	18,9	23,8	17,1	14,6

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AS-FT	GS-FT	AS-A_inicial	AS-B_inicial	AS-B_DS
2,3,4,6-Me ₄ Man	T-Man	1,3	1,3	0,9	0,8	2,0
2,3,4-Me ₃ Man	6-Man	1,6	1,5	0,5	1,1	0,8
2,6-Me ₂ Man	3,4-Man	3,2	3,4	2,0	0,9	3,1
4,6-Me ₂ Man	2,3-Man	0,7	0,7	-	0,5	1,1
3,6-Me ₂ Man	2,4-Man	1,0	1,0	0,8	0,8	-
2,3-Me ₂ Man	4,6-Man	0,2	-	0,5	0,4	0,7
6-Me Man	2,3,4-Man	1,4	1,1	1,4	1,8	1,2
2-Me Man	3,4,6-Man	0,3	-	0,1	0,3	-
Man	2,3,4,6-Man	1,3	0,7	3,1	3,2	1,4
	Total	11,1	9,6	9,3	9,8	10,3
2,3,4,6-Me ₄ Gal	T-Gal	4,7	4,6	3,4	2,3	5,7
3,4,6-Me ₃ Gal	2-Gal	1,6	1,6	1,9	1,3	3,1
2,3,6-Me ₃ Gal	4-Gal	2,8	3,0	2,6	5,3	2,9
2,3,4-Me ₃ Gal	6-Gal	0,8	0,8	0,8	0,5	0,7
4,6-Me ₂ Gal	2,3-Gal	0,5	0,4	0,3	0,4	1,3
3,4-Me ₂ Gal	2,6-Gal	-	-	0,7	1,1	-
2,3-Me ₂ Gal	4,6-Gal	0,8	0,7	-	-	-
6-Me Gal	2,3,4-Gal	2,4	2,0	1,9	1,8	1,7
2-Me Gal	3,4,6-Gal	2,4	-	0,9	1,0	-
4-Me Gal	2,3,6-Gal	0,4	0,4	0,3	0,5	-
Gal	2,3,4,6-Gal	3,0	3,6	10,6	6,1	3,9
	Total	19,2	17,0	23,2	20,1	19,1

3.2. Fracionamento por cromatografia de troca aniônica

Pelos resultados obtidos nas análises anteriores pode-se concluir que as amostras de águas das salinas são matrizes complexas, contendo vários polissacarídeos constituídos por uma grande variedade de monossacarídeos e de ligações glicosídicas, não permitindo obter uma informação clara sobre a estrutura dos polissacarídeos presentes nas amostras. Assim, as amostras iniciais foram fracionadas através de cromatografia de troca aniônica, de forma a possibilitar a separação de grupos de polissacarídeos com diferentes cargas uma vez que são constituídos por um elevado conteúdo em ácidos urônicos e contêm ésteres de sulfato.

As duas amostras de água de superfície foram colocadas numa coluna de troca iônica DEAE-Trisacryl, sendo a eluição realizada com soluções de NaCl com força iônica crescente. Os perfis cromatográficos das amostras AS-A e AS-B encontram-se representados na figura 11. É possível verificar que ambas as amostras têm um perfil semelhante, dado que a maior parte dos polissacarídeos foram eluídos com NaCl 0,125 M, 0,25 M e 0,5 M, tendo sido também possível isolar um grupo que foi eluído com

tampão sem força iônica. Na amostra AS-A foi possível obter um grupo de polissacarídeos eluídos com NaCl 1M e outro com NaCl 2M, enquanto que na amostra AS-B foi possível obter dois grupos de polissacarídeos eluídos com NaCl 1M.

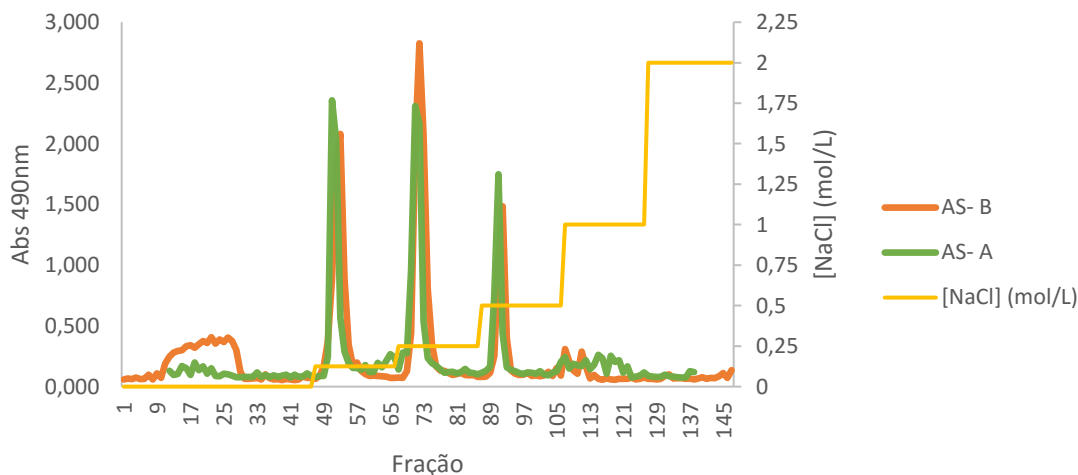


Figura 11 – Perfis das amostras iniciais de água das salinas obtidos por cromatografia de troca iônica.

Pode-se verificar pela tabela 4 que os grupos com maior rendimento em massa (%m/m) foram eluídos com NaCl 0,125 M, 0,25 M e 0,5 M. Para além disso, são também os grupos que apresentam maior quantidade de açúcares, uma vez que no caso da amostra AS-A a quantidade de açúcares varia entre 243 e 391 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e no caso da amostra AS-B varia entre 385 e 452 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Estes três grupos de polissacarídeos apresentam também teores diferentes de sulfato e de proteína, sendo que o teor de sulfato aumenta com o aumento da força iônica do eluente (variando de 0,2% a 5,9% de sulfatos), enquanto que com os teores de proteína acontece o inverso (variando de 13,8% a 23,1%).

Tendo em consideração estes resultados pode-se concluir que foi possível separar as amostras iniciais de acordo com a sua quantidade em sulfatos, que conferem carga negativa aos polissacarídeos, uma vez que se obteve uma fração eluída com NaCl 0,125M com 0% de sulfatos, uma fração eluída com NaCl 0,25 M com 2% de sulfatos e uma fração eluída com NaCl 0,5 M com 6% de sulfatos em ambas as amostras de água.

Tabela 4 – Rendimento e composição (µg/mg) das frações obtidas por cromatografia de troca iónica das amostras iniciais AS-A e AS-B.

		Rendimento %(m/m)	Composição (µg/mg)		
			Total açúcares	Ésteres de sulfato	Proteína
AS-A	Tampão	4,9	207	n.a.	n.a.
	NaCl 0,125 M	17,5	243	2	231
	NaCl 0,25 M	18,2	325	22	180
	NaCl 0,5 M	7,4	391	59	138
	NaCl 1 M	1,6	259	n.a.	n.a.
	NaCl 2 M	3,2	202	n.a.	n.a.
AS-B	Tampão	13,7	284	n.a.	n.a.
	NaCl 0,125 M	18,0	385	0	164
	NaCl 0,25 M	26,8	418	19	129
	NaCl 0,5 M	9,8	452	60	109
	NaCl 1 M - A	1,6	354	n.a.	n.a.
	NaCl 1 M - B	1,5	333	n.a.	n.a.

n.a. – não analisado

Foram realizadas análises de açúcares neutros e determinação do teor em ácidos urónicos a todos os grupos de polissacarídeos recolhidos da cromatografia de troca aniónica. Pelos resultados apresentados na tabela 5 é possível verificar que, tal como nas amostras iniciais, os resíduos que estão presentes em maior quantidade são os ácidos urónicos, com a percentagem molar a variar entre 13 e os 45% nas frações da amostra AS-A e entre 20 e 36% nas frações da amostra AS-B.

Relativamente aos açúcares neutros, em geral a galactose é o resíduo maioritariamente presente, com a sua percentagem molar a variar entre os 9 e 17% nas frações de ambas as amostras. Depois da galactose, os resíduos de fucose e de glucose são aqueles que apresentam maiores concentrações, sendo que nas frações da amostra AS-A a fucose varia entre 8 e 22%mol e a glucose entre 9 e 16%mol, enquanto que nas frações da amostra AS-B a fucose varia entre 10 e 22%mol e a glucose entre 9 e 11%mol. Tal como nas amostras iniciais também é possível encontrar nas frações de ambas as amostras a presença de resíduos de manose (entre 5 e 13%mol para AS-A e entre 4 e 12%mol para AS-B) e de xilose (entre 5 e 15%mol para AS-A e entre 5 e 11%mol para AS-B). Embora estejam presentes em menor quantidade, estas frações também contêm resíduos de ramnose (entre 5 e 8%mol para AS-A e entre 5 e 12%mol para AS-B) e de arabinose (entre 2 e 6%mol para AS-A e 5 e 10%mol para AS-B).

Apesar das frações continuarem a apresentar uma composição em açúcares relativamente semelhante entre si, é importante destacar o facto de que com o aumento

da força iônica foram eluídas frações mais ricas em fucose, nomeadamente as frações eluídas sem NaCl contêm 12%mol de fucose enquanto as frações eluídas com NaCl 0,5 M contêm entre 17 e 22%mol. No entanto, o contrário aconteceu com o teor em xilose (cerca de 11 a 15%mol nas frações neutras e 5%mol nas frações eluídas com NaCl 0,5 M). Esta variação está de acordo com a análise de metilação, pois verificou-se que os resíduos de fucose estão sulfatados, enquanto os de xilose não apresentaram resíduos substituídos com ésteres de sulfato

Tabela 5 – Composição em açúcares (% molar) dos grupos de polissacarídeos recolhidos na cromatografia de troca iônica.

		Composição em Açúcares (%mol)									Total açúcares (µg/mg)
		Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	HexA	
AS-A	Inicial	9	10	1	4	9	8	13	11	35	396
	Tampã	8	13	0	6	15	13	16	16	13	207
	0,125 M	8	11	0	4	8	5	10	10	45	243
	0,25 M	6	13	0	3	7	6	13	10	43	325
	0,5 M	7	17	0	2	5	10	13	12	33	391
	1 M	7	22	0	2	6	10	17	9	27	259
	2 M	5	8	18	6	9	6	9	9	31	202
AS-B	Inicial	7	10	1	8	9	5	10	8	42	450
	Tampão	5	12	0	10	11	4	17	11	30	284
	0,125 M	7	13	0	6	11	8	11	11	33	385
	0,25 M	7	18	0	6	8	5	14	9	33	418
	0,5 M	8	22	0	5	6	5	14	10	29	452
	1 M - A	6	10	0	10	11	5	10	11	36	354
	1 M - B	12	19	0	5	5	12	16	11	20	333

Dado que as frações eluídas com NaCl 0,125 M, 0,25 M e 0,5 M contêm maior quantidade de açúcar e apresentam diferentes teores de sulfatos foi realizada uma análise de açúcares por metilação destas frações com o objetivo de se obter mais dados que ajudem a esclarecer a estrutura destes polissacarídeos.

Pela tabela 6 é possível verificar que em todas as frações é possível identificar as ligações características de polissacarídeos de origem marinha, discutidos anteriormente para as amostras iniciais. Comparando a fração AS-B_NaCl 0,500 M com a fração AS-B_NaCl 0,125M verifica-se que tem menor quantidade de resíduos de glucose, manose e galactose ramificados, não sendo identificados os resíduos 3,6-Glc, 2,3,4-Glc, 3,4,6-Glc, 4,6-Man, 2,3,4-Man, 2,3,4,6-Man, 2,3,4-Gal, 3,4,6-Gal e 2,3,6-Gal, enquanto que a

amostra AS-B_NaCl 0,125M se apresenta como a fração mais ramificada. Contudo apesar da amostra eluída com NaCl 0,500M ter menos resíduos ramificados identificados, quando comparada com as restantes frações esta apresenta uma quantidade relativa superior daqueles que indicam a presença de grupos sulfato, nomeadamente 2,3,5-Ara, 3,4-Fuc, 2,3,4-Fuc e 2,3,4,6-Gal, estando de acordo com os valores determinados para o teor em sulfato destas frações.

Tabela 6 – Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados das frações obtidas por cromatografia de troca iónica.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AS-B_inicial	AS-B_0,125M	AS-B_0,25 M	AS-B_0,5 M
2,3,5-Me ₃ Ara	T-Ara	0,4	1,0	0,3	0,4
3,5-Me ₂ Ara	2-Ara	1,1	1,0	0,7	3,1
2,5-Me ₂ Ara	3-Ara	0,6	0,5	0,3	0,4
2,3-Me ₂ Ara	5-Ara	1,1	1,1	0,6	2,8
2-Me Ara	3,5-Ara	1,0	0,6	-	-
3,5-Me ₂ Ara	2,4-Ara	2,3	2,7	1,8	1,1
3-Me Ara	2,5-Ara	2,9	1,7	1,6	-
4-Me Ara	2,3,5-Ara	4,5	1,3	3,1	6,2
	Total	13,9	9,8	8,5	14,0
2,3,4-Me ₃ Xyl	T-Xyl	4,3	9,6	5,9	6,0
3,4-Me ₂ Xyl	2-Xyl	2,4	3,4	1,6	-
2,4-Me ₂ Xyl	3-Xyl	1,1	1,3	1,0	0,4
2,3-Me ₂ Xyl	4-Xyl	2,8	3,9	1,9	-
2-Me Xyl	3,4-Xyl	0,7	1,3	1,3	1,5
	Total	11,2	19,5	11,6	7,9
2,3,4-Me ₃ Rha	T-Rha	0,9	3,2	2,2	1,6
3,4-Me ₂ Rha	2-Rha	3,3	5,3	3,6	4,5
2,4-Me ₂ Rha	3-Rha	0,7	1,3	0,7	1,2
3-Me Rha	2,4-Rha	1,1	0,6	0,8	-
Rha	2,3,4-Rha	3,8	2,3	2,8	1,1
	Total	9,8	12,7	10,0	8,4
2,3,4-Me ₃ Fuc	T-Fuc	1,3	4,2	1,1	1,8
2,4-Me ₂ Fuc	3-Fuc	0,9	1,3	1,0	1,1
2-Me Fuc	3,4-Fuc	3,3	4,1	3,5	4,8
4-Me Fuc	2,3-Fuc	0,8	0,6	1,2	1,0
Fuc	2,3,4-Fuc	8,9	5,5	6,3	8,1
	Total	15,1	15,7	13,1	16,8

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AS-B_inicial	AS-B_0,125M	AS-B_0,25 M	AS-B_0,5 M
2,3,4,6-Me ₄ Glc	T-Glc	2,9	6,6	6,3	7,2
2,3,6-Me ₃ Glc	4-Glc	3,9	7,0	8,4	10,6
4,6-Me ₂ Glc	2,3-Glc	0,8	0,8	1,3	0,8
2,3-Me ₂ Glc	4,6-Glc	0,6	0,9	0,8	0,9
2,4-Me ₂ Glc	3,6-Glc	0,7	0,4	0,8	-
6-Me Glc	2,3,4-Glc	0,9	1,0	1,5	-
2-Me Glc	3,4,6-Glc	1,4	0,7	-	-
4-Me Glc	2,3,6-Glc	1,6	-	-	-
Glc	2,3,4,6-Glc	7,3	2,1	3,3	2,0
	Total	20,0	19,4	22,5	21,5
2,3,4,6-Me ₄ Man	T-Man	0,8	1,7	2,5	2,2
2,3,4-Me ₃ Man	6-Man	1,1	1,6	1,4	1,0
2,6-Me ₂ Man	3,4-Man	0,9	1,1	2,1	1,5
4,6-Me ₂ Man	2,3-Man	0,5	-	-	-
3,6-Me ₂ Man	2,4-Man	0,8	0,7	1,3	1,2
2,3-Me ₂ Man	4,6-Man	0,4	0,6	0,9	-
6-Me Man	2,3,4-Man	1,8	1,3	1,4	-
2-Me Man	3,4,6-Man	0,3	-	-	-
Man	2,3,4,6-Man	3,2	0,5	0,6	-
	Total	9,8	7,5	10,2	5,9
2,3,4,6-Me ₄ Gal	T-Gal	2,3	4,7	10,8	12,5
3,4,6-Me ₃ Gal	2-Gal	1,3	2,3	2,3	2,7
2,3,6-Me ₃ Gal	4-Gal	5,3	2,4	2,5	2,4
2,3,4-Me ₃ Gal	6-Gal	0,5	0,8	1,0	-
4,6-Me ₂ Gal	2,3-Gal	0,4	0,6	1,0	0,5
3,4-Me ₂ Gal	2,6-Gal	1,1	-	-	-
6-Me Gal	2,3,4-Gal	1,8	1,3	1,2	-
2-Me Gal	3,4,6-Gal	1,0	1,4	1,1	-
4-Me Gal	2,3,6-Gal	0,5	0,6	-	-
Gal	2,3,4,6-Gal	6,1	2,4	4,3	7,2
	Total	20,1	16,5	24,2	25,3

As amostras AS-B_NaCl 0,125 M, 0,25 M e 0,5 M têm diferentes quantidades de ésteres de sulfato, apresentam a maior quantidade de açúcares entre as frações obtidas pela troca iônica e têm algumas diferenças estruturais em termos de ligações glicosídicas, sendo estes os motivos pelos quais foram selecionadas para a fase seguinte de purificação.

3.3. Fracionamento por cromatografia de exclusão molecular

Pelos resultados verificados no fracionamento por coluna de troca iônica é possível afirmar que as amostras iniciais foram separadas em três frações com diferentes teores de sulfatos. Uma vez que, em geral, a restante composição destas frações é semelhante

procedeu-se a um outro passo de purificação com o objetivo de que em cada uma das 3 frações fosse possível identificar diferentes populações de polissacarídeos. Para tal realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular para as amostras AS-A_NaCl 0,125 M, AS-A_NaCl 0,25 M e AS-A_NaCl 0,5 M.

Dado que o peso molecular dos polissacarídeos marinhos é muito variável decidiu-se que esta cromatografia seria realizada numa coluna cromatográfica contendo gel Sephacryl S-300, cuja gama de fracionamento de dextranas é de 2 a 400 kDa. Esta gama de fracionamento permite verificar se os polissacarídeos presentes nestas frações são polissacarídeos de alto ou baixo peso molecular.

Em primeiro lugar realizou-se a calibração da coluna Sephacryl S-300 com dextrana azul e glucose, de forma a ser possível identificar qual o volume de exclusão e de inclusão da coluna, respetivamente. Foi possível concluir que o volume de exclusão é 89 mL e o volume de inclusão é 176 mL, ou seja, polissacarídeos com peso molecular superior a 400 kDa são eluídos no volume de exclusão, enquanto que polissacarídeos com peso molecular inferior a 2kDa são eluídos no volume de inclusão.

Pela observação dos cromatograma obtidos para cada uma das amostras (figura 11) é possível verificar que as 3 frações recolhidas na cromatografia de troca aniónica apresentam perfis semelhantes em termos de pesos moleculares. Cada amostra foi dividida em 4 populações (figura 12): Grupo I - população de alto peso molecular, contendo polissacarídeos que foram eluídos no volume de exclusão, ou seja, polissacarídeos cujo peso molecular aparente é superior a 400 kDa; Grupo II - população de alto peso molecular com peso molecular inferior a 400 kDa; Grupo III - população de peso molecular médio; e Grupo IV - população com polissacarídeos que foram eluídos no volume de inclusão, ou seja, polissacarídeos com peso molecular inferior a 2 kDa.

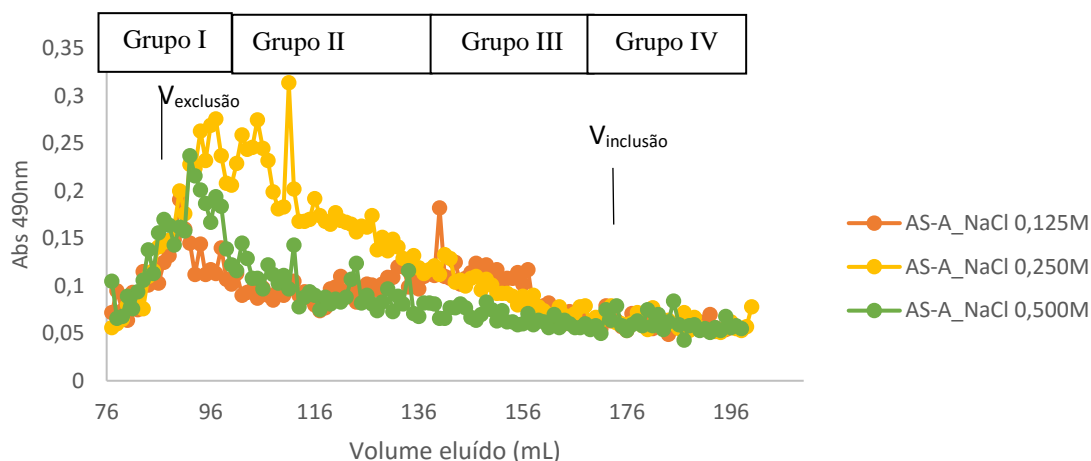


Figura 12 – Perfis cromatográficos das amostras AS-A_NaCl 0,125 M, AS-A_NaCl 0,25 M e AS-A_NaCl 0,5 M eluídas na coluna de cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-300.

Como se pode observar na tabela 7 estas frações têm um conteúdo em açúcares que varia entre 63 e 322 $\mu\text{g}/\text{mg}$, sendo que no caso da amostra AS-A_NaCl 0,125 M a fração com maior quantidade de açúcares é o grupo II (322 $\mu\text{g}/\text{mg}$), no caso da amostra AS-A_NaCl 0,25 M são os grupos I, II e III (201 - 229 $\mu\text{g}/\text{mg}$) e no caso da amostra AS-A_NaCl 0,5 M são os grupos I e II (288 - 279 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

Tabela 7 – Composição em açúcares (% molar) e rendimento (% m/m) dos grupos de polissacarídeos recolhidos na cromatografia de exclusão molecular.

	Rendimento (%m/m)	Composição em Açúcares (%mol)								Total açúcares ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	HexA	
AS-A_0,125 M		8	11	4	8	5	10	10	45	243
Grupo I	13,1	7	12	6	12	5	7	16	35	216
Grupo II	9,0	8	8	2	8	8	10	11	45	322
Grupo III	12,3	8	6	1	6	4	3	10	61	154
Grupo IV	8,1	0	0	0	11	8	4	23	54	63
AS-A_0,25 M		6	13	3	7	6	13	10	43	325
Grupo I	18,5	8	17	3	13	6	12	12	29	201
Grupo II	18,2	7	14	3	11	6	12	12	37	216
Grupo III	21,0	7	11	3	8	6	11	16	40	229
Grupo IV	17,7	9	10	2	6	8	14	14	37	158
AS-A_0,5 M		7	17	2	5	10	13	12	33	391
Grupo I	38,7	8	18	2	8	6	12	11	35	288
Grupo II	27,6	9	12	2	8	8	12	16	34	279
Grupo III	15,3	8	6	1	10	8	10	27	30	162
Grupo IV	16,0	0	0	0	7	5	6	21	61	116

Tal como nas amostras iniciais e nas frações recolhidas na cromatografia de troca aniônica, também estas frações são ricas em ácidos urónicos, sendo estes os resíduos de açúcar maioritariamente presentes. No caso da amostra AS-A eluída com NaCl 0,125 M, a quantidade de ácidos urónicos varia entre 36 µg/mg (no grupo IV) e 155 µg/mg (no grupo II), fazendo com que em termos de composição relativa de açúcares os ácidos urónicos variem entre 35 e 64%. Relativamente à amostra AS-A eluída com NaCl 0,25 M, a quantidade de ácidos urónicos varia entre 62 µg/mg e 98 µg/mg, e na amostra AS-A eluída com NaCl 0,5 M a quantidade varia entre 53 e 111 µg/mg.

Relativamente aos açúcares neutros, verifica-se que nas frações da amostra AS-A_NaCl 0,125 M, o resíduo maioritariamente presente é a glucose, que varia entre 10 e 23 %mol, seguida pela xilose (6 e 12 %mol), fucose (6 e 12%mol) e galactose (3 e 10%mol). A ramnose, a manose e a arabinose também estão presentes nas frações desta amostra, com a sua composição a variar entre 0-8% molar, 4-8% molar e 0-6% molar, respetivamente. Comparando a composição em monossacarídeos dos vários grupos obtidos pela cromatografia de exclusão molecular com a composição da fração obtida na troca iónica verifica-se que o grupo II é o mais semelhante, enquanto que no grupo I se observa um enriquecimento no teor em glucose e xilose e uma diminuição no teor em galactose e ácidos urónicos.

Nas frações da amostra AS-A_NaCl 0,25 M verifica-se que o resíduo de açúcar neutro presente em maior quantidade é a fucose, variando entre 10 e 17 %molar, seguida pela glucose e pela galactose que variam entre 12 e 16%mol. A composição em xilose destas frações varia entre 6 e 13%mol, enquanto que a composição em manose e ramnose varia entre 6 e 9 %mol. O resíduo presente em menor quantidade é a arabinose, cuja percentagem molar varia entre 2 e 3%. Tal como na amostra AS-A_NaCl 0,125 M, o grupo com a composição mais semelhante à amostra inicial é o grupo II, enquanto que no grupo I se verifica um aumento do teor em fucose e em xilose e uma diminuição da quantidade de ácidos urónicos.

Relativamente às frações da amostra AS-A_NaCl 0,5M, verifica-se que os resíduos de açúcares neutros presentes em maior quantidade são a fucose (0-18 %mol) e a glucose (11-27%mol), seguidos pelos resíduos de galactose (6-12%mol). A composição em percentagem molar de manose, ramnose e xilose destas frações varia entre 7 e 10%, enquanto que a composição em arabinose varia entre 0 e 2%. Tendo em consideração a composição de todos os grupos verifica-se que o grupo I é o que apresenta uma

composição mais semelhante à da amostra AS-A_NaCl 0,5 M, sendo que no grupo II pode ser observada uma diminuição do teor em fucose e um enriquecimento do teor em glucose.

Tendo em consideração todos os resultados apresentados é possível concluir que os vários passos de purificação permitiram separar os polissacarídeos da água das salinas de acordo com o seu teor em sulfato e de acordo com o seu peso molecular aparente. Contudo verifica-se que apesar destas duas diferenças, a composição em açúcares destes compostos continua a ser muito semelhante mesmo após os vários fracionamentos, concluindo-se que não é possível separar tipos de polissacarídeos específicos como carragenanas ou fucoidanas, que são polissacarídeos ricos em resíduos de monossacarídeos específicos.

3.4. Hidrólise enzimática com proteases

Com base nos resultados apresentados anteriormente verifica-se que as populações obtidas pela cromatografia de exclusão molecular que contêm maior quantidade de açúcares são as de peso molecular aparente mais elevado. Contudo estes polissacarídeos são muito solúveis em água e não contêm uma quantidade de sulfatos ou de ácidos urónicos tão elevada que justificasse a elevada solubilidade de polissacarídeos com este peso molecular. Tendo em conta que a análise elementar às amostras iniciais e às frações obtidas por cromatografia de troca iónica revelou a presença de 10 a 20% de proteína, foi colocada a hipótese de que estes polissacarídeos tivessem um peso molecular tão elevado devido ao facto de estarem ligados à proteína.

Procedeu-se então ao fracionamento da amostra inicial AS-A por cromatografia de exclusão molecular e, de seguida, procedeu-se à realização de uma hidrólise enzimática com proteases das frações com polissacarídeos de maior peso molecular (Grupo I e II). As amostras AS-A – Grupo I e Grupo II correspondem às frações da amostra inicial eluídas entre os 76 mL e os 112 mL, e entre os 113 mL e os 146 mL, respetivamente. Os perfis cromatográficos obtidos tanto para a amostra AS-A inicial como para os grupos hidrolisados encontram-se representados na figura 13.

Verifica-se que a amostra inicial foi hidrolisada devido ao aparecimento de alguns picos na zona de baixo peso molecular no caso das amostras hidrolisadas e ao desaparecimento de uma banda correspondente aos polissacarídeos de alto peso molecular eluídos entre os 97 mL e os 116 mL na amostra inicial. Contudo, continuam a

ser eluídas frações com polissacarídeos de elevado peso molecular (volume de exclusão) nas amostras hidrolisadas, nomeadamente no Grupo I. Tendo em consideração estes resultados podem-se colocar duas hipóteses: 1) as proteases não conseguiram clivar todas as ligações entre proteínas e polissacarídeos continuando a existir material polimérico de alto peso molecular, 2) as amostras de água das salinas possuem de facto polissacarídeos com pesos moleculares iguais ou superiores a 400 kDa que não se encontram ligados a proteína.

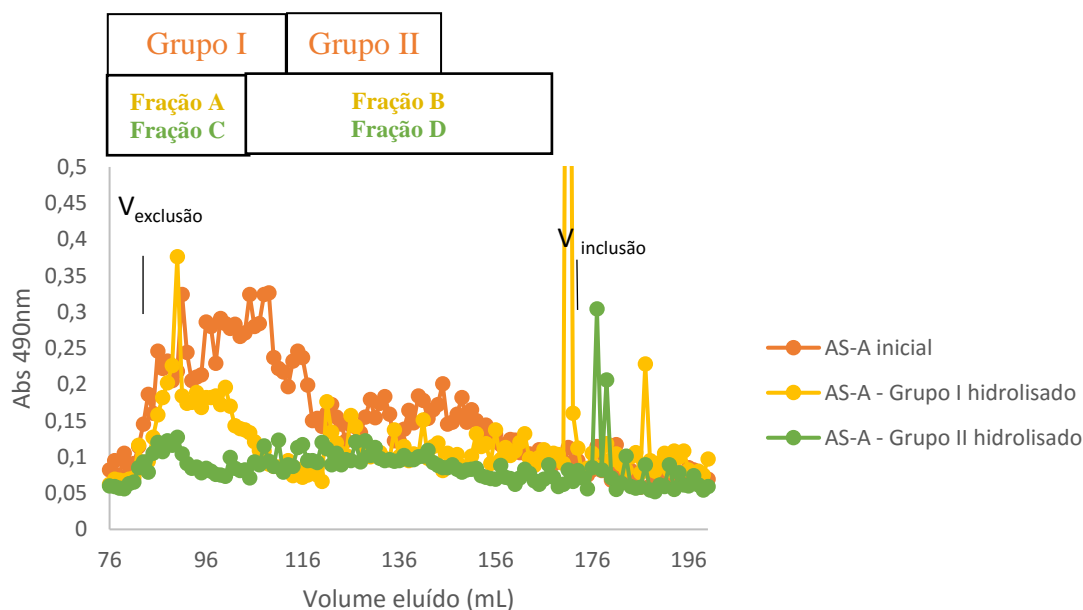


Figura 13 – Perfis cromatográficos das amostras AS-A_inicial e AS-A – Grupo I hidrolisado e AS-A – Grupo II hidrolisado eluídas na coluna de cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-300.

Observando os perfis cromatográficos decidiu-se separar duas frações de cada grupo hidrolisado e estudar a sua composição em monossacarídeos. Assim, para o Grupo I hidrolisado obteve-se uma primeira fração (Fração A) constituída pelo volume de eluição de 76 a 105 mL e uma segunda fração (Fração B) constituída pelo volume de eluição de 106 a 164 mL. No Grupo II a constituição das frações é semelhante, com uma fração (Fração C) a ser constituída pelo volume de eluição de 76 a 99 mL e outra fração (Fração D) a ser constituída pelo volume de eluição de 100 a 170 mL.

A composição em monossacarídeos destas quatro frações encontra-se apresentada na tabela 8 e é possível verificar que se obteve um enriquecimento na quantidade de açúcares da amostra no caso do Grupo I hidrolisado – Fração A, uma vez que enquanto a amostra inicial contém 396 µg/mg, esta fração contém 608 µg/mg. Para além da quantidade total de açúcares, a composição em monossacarídeos também difere um pouco nesta fração, uma vez que se verifica um aumento no teor em ácidos urónicos (35%mol na AS-

A_inicial e 50%mol na Fração A) e glucose (11%mol na AS-A_inicial e 20%mol na Fração A). Por outro lado, há uma diminuição do teor em ramnose (9%mol na amostra inicial e 2%mol na Fração A), fucose (10%mol na amostra inicial e 6%mol na Fração A), xilose (9%mol para 5%mol), manose (8%mol para 5%mol) e galactose (13%mol para 11%mol).

Relativamente às restantes frações verifica-se que a quantidade de açúcares totais é inferior à da amostra inicial, uma vez que a Fração B contem 220 µg/mg, a Fração C contem 146 µg/mg e a Fração D contem 190 µg/mg. Quanto à composição destas frações, observa-se que o teor em ácidos urónicos é semelhante ao da amostra inicial, sendo o componente maioritário. Comparativamente à amostra inicial, todas as frações sofrem uma diminuição do teor em ramnose (de 9 para 2%) e um aumento do teor em glucose (11% na amostra inicial, variando de 20 a 39% nas quatro frações), contudo pensa-se que esta quantidade de glucose é um artefacto provocado pela contaminação de metilcelulose, proveniente das mangas de diálise. Na Fração B do grupo I hidrolisado observa-se também um aumento do teor em xilose, passando de 8% para 25%, o que não se verifica nas restantes frações.

Tabela 8 – Composição em açúcares (%molar) dos grupos de polissacarídeos recolhidos na cromatografia de exclusão molecular.

		Composição em Açúcares (%mol)								Total açúcares (µg/mg)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác. Urónicos	
	AS-A_inicial	9	10	4	9	8	13	11	35	396
Grupo I hidrolisado	Fração A	2	6	3	5	5	11	20	50	608
	Fração B	2	3	0	25	3	12	21	34	220
Grupo II hidrolisado	Fração C	2	4	1	8	4	6	39	36	146
	Fração D	4	4	3	6	5	6	27	44	190

Tendo em conta estes resultados verifica-se que a hidrólise com proteases permite o enriquecimento da amostra em açúcares, nomeadamente nas frações de alto peso molecular. Estes resultados permitem colocar como hipótese mais provável que as amostras de água das salinas possuem de facto polissacarídeos com pesos moleculares iguais ou superiores a 400 kDa que não se encontram ligados a proteína, uma vez que

após a hidrólise continuam a ser eluídos polissacarídeos no volume de exclusão. Contudo, o facto de terem surgido picos de oligossacarídeos nos perfis cromatográficos após a hidrólise com proteases pode levar à hipótese de existirem na amostra algumas proteínas ligadas a polissacarídeos através por exemplo de reações de Maillard, formando uma malha que após a hidrólise é apenas parcialmente clivada.

3.5. Avaliação de atividades biológicas

A semelhança estrutural, nomeadamente o facto de serem polissacarídeos sulfatados e de terem na sua constituição elevado teor em ácidos urónicos, com os polissacarídeos de origem marinha e compostos biologicamente ativos como as glicosaminoglicanas leva a um interesse crescente na investigação das potencialidades biológicas destes polissacarídeos. Na literatura já se encontram descritas várias atividades para os diferentes tipos de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas. A estrutura dos polissacarídeos da água das salinas ainda não está completamente esclarecida, tendo-se verificado que se trata de uma matriz complexa com uma mistura de vários polissacarídeos. Assim, é necessário investigar se estes polissacarídeos da água das salinas possuem o mesmo tipo de atividades dos polissacarídeos presentes nas algas. Neste trabalho foram estudadas duas atividades biológicas, nomeadamente, a atividade imunoestimuladora e a atividade antioxidante.

3.5.1. Avaliação da atividade imunoestimuladora

A atividade imunoestimuladora foi avaliada pela estimulação direta de linfócitos B e linfócitos T. Este estudo foi realizado em todas as amostras iniciais e em algumas das frações purificadas, nomeadamente as que foram obtidas pela cromatografia de troca iónica por eluição com NaCl 0,125 M, 0,25 M e 0,5 M e as frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular designadas como “Grupo II” das amostras AS-A_0,125 M, 0,25 M e 0,5 M. Para as amostras iniciais e para as frações obtidas por cromatografia de troca iónica foram testadas concentrações de 25, 50 e 75 µg de polissacarídeo/mL, enquanto para as frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular foram testadas concentrações de 10, 15 e 20 µg de polissacarídeo/mg de amostra. Os resultados obtidos com as amostras são comparados aos resultados obtidos

com um controlo negativo (RPMI) e com um controlo positivo (LPS no caso dos linfócitos B e Concanavalina A no caso dos linfócitos T).

Os ensaios realizados permitiram verificar que a viabilidade celular dos linfócitos após a administração das amostras não variou muito relativamente aos controlos, uma vez que nas amostras este valor variou entre 71 e 86% e nos controlos este valor variou entre os 75 e 81%, o que significa que nenhuma das amostras é citotóxica, não provocando morte celular. Relativamente à atividade imunoestimuladora, alguns dos citogramas obtidos nos ensaios dos três tipos de amostra (inicial, troca iónica e exclusão molecular) encontram-se na figura 14. É possível comparar a marcação presente nas amostras com a marcação dos controlos, verificando-se diferenças no valor presente no quadrante Q2, que corresponde à percentagem de imunoestimulação. A amostra inicial apresenta 33,9% e a fração obtida por troca iónica 43,5%, tendo ambas uma marcação semelhante ao controlo positivo (cuja imunoestimulação é de 52,9%), enquanto que a fração da exclusão molecular apresenta 15,5% com uma marcação semelhante à do controlo negativo (sendo a sua percentagem de imunoestimulação de 16,9%).

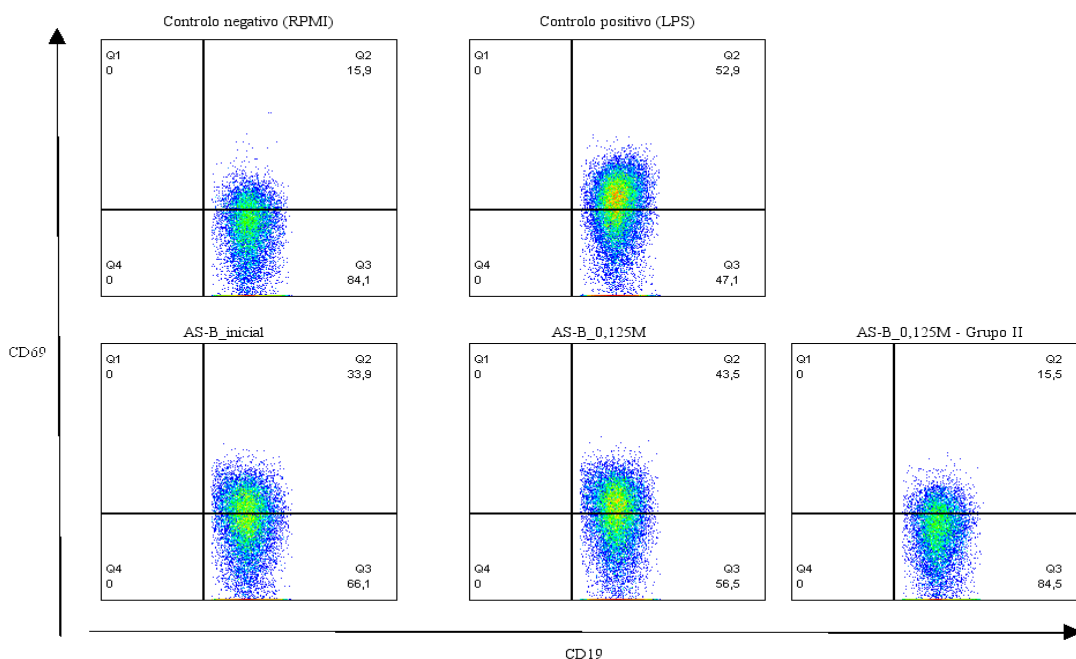


Figura 14 – Citogramas obtidos nos ensaios de imunoestimulação do controlo negativo (RPMI), controlo positivo (LPS), e amostras AS-B_inicial, AS-B_0,125M e AS-B_0,125M – Grupo II.

As amostras iniciais, material polimérico das águas, apresentaram atividade imunoestimuladora para todas as concentrações testadas relativamente aos linfócitos B,, uma vez que o RPMI (controlo negativo) apresenta cerca de 16% de estimulação e as

amostras variam entre 28 e 37%, sendo que a amostra AS-A apresenta atividade ligeiramente inferior às restantes amostras (Figura 15). Não se verificam diferenças na percentagem de estimulação entre as três concentrações, como já se tinha descrito num trabalho anterior com polissacarídeos da água das salinas (89).

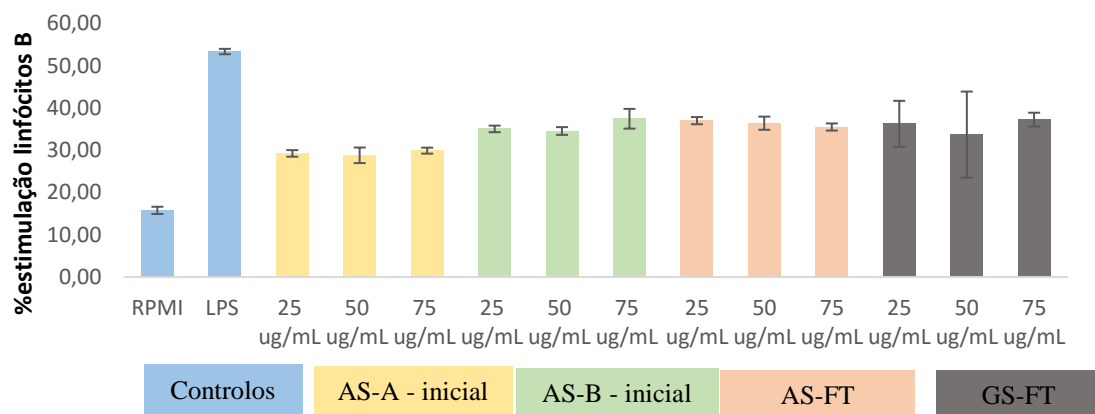


Figura 15 – Percentagem de estimulação dos linfócitos B nas amostras iniciais.

Na figura 16 podemos observar os resultados obtidos para as frações da cromatografia de troca iónica. Tal como aconteceu nas amostras iniciais, todas as frações em todas as concentrações conseguem estimular a ativação de linfócitos B, não existindo diferenças entre as concentrações. Existe contudo algumas diferenças na estimulação produzida pelas diferentes frações, uma vez que a amostra AS-B_0,125 M apresenta, em média, entre 42 e 50% de estimulação enquanto as amostras AS-B_0,25 M e AS-B_0,5 M apresentam, em média, entre 28 e 31% de estimulação dos linfócitos B. O facto da amostra AS-B_0,125 M não conter sulfatos na sua composição e ao mesmo tempo ser a amostra com atividade imunoestimuladora relativamente mais elevada leva a concluir que esta atividade biológica não depende apenas da sulfatação da amostra, ao contrário do que está descrito na literatura para este tipo de polissacarídeos (66,68).

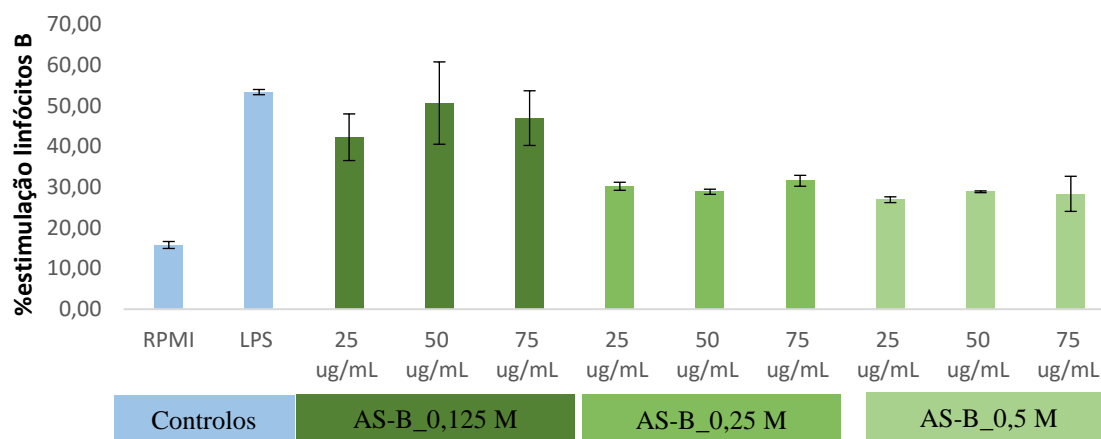


Figura 16 – Percentagem de estimulação dos linfócitos B nas frações obtidas por cromatografia de troca iónica.

Por último foram realizados ensaios de imunoestimulação às frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular designadas por “Grupo II”, ou seja, frações com peso molecular relativamente elevado mas inferior a 400kDa, provenientes das frações obtidas pela troca iónica. Os resultados apresentados na figura 17 revelam que estas frações não têm atividade imunoestimuladora em qualquer das concentrações testadas, encontrando-se com valores de estimulação semelhantes aos do controlo negativo (entre 15 e 17%). A atividade imunoestimuladora pode estar em outro grupo da cromatografia da exclusão molecular que não foram estudados. Assim, num trabalho futuro seria necessário testar a atividade imunoestimuladora de todas as frações recolhidas pela cromatografia de exclusão molecular de forma a identificar se algum grupo tem esta atividade.

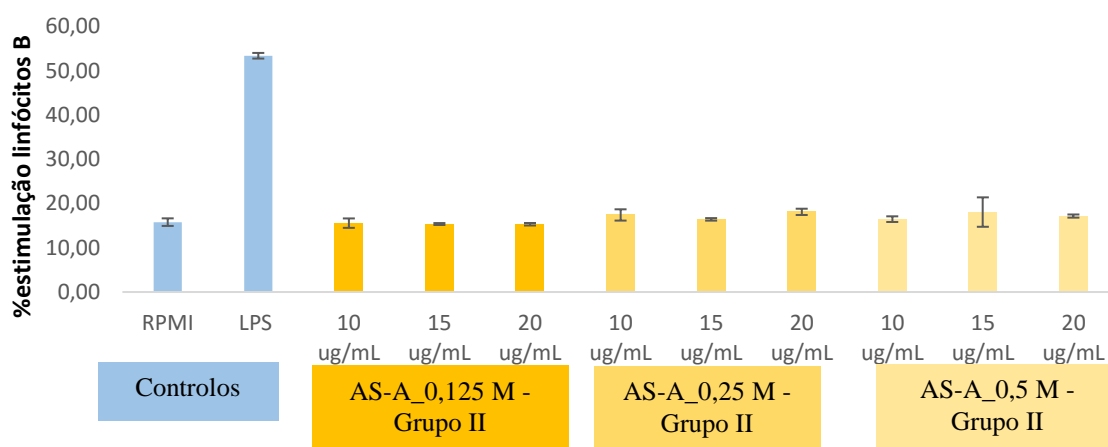


Figura 17 – Percentagem de estimulação dos linfócitos B nas frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular.

Relativamente aos linfócitos T concluiu-se que nenhuma das amostras, quer iniciais quer provenientes das cromatografias, em qualquer concentração, consegue estimular a sua ativação, estando os valores entre os 6 e os 11% (sendo o valor do controlo negativo cerca de 8%). Contudo não se esperaria que estes compostos conseguissem estimular diretamente os linfócitos T, sendo necessário outro tipo de mecanismos para desencadear esta ativação.

Os resultados obtidos para a avaliação desta atividade biológica são preliminares sendo necessário realizar outro tipo de ensaios, utilizando por exemplo macrófagos ou células dendríticas, para ser possível retirar conclusões mais detalhadas sobre os efeitos destes polissacarídeos no sistema imunitário. Contudo é notório que tanto as amostras iniciais como as amostras obtidas pela troca iónica têm potencial atividade imunoestimuladora, não existindo diferenças significativas entre as várias amostras testadas. Estes resultados permitem concluir que não é necessário recorrer ao fracionamento das amostras iniciais para se poder utilizar este tipo de polissacarídeos como imunoestimuladores.

3.5.2. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante das amostras iniciais e das frações AS-B_0,125 M, AS-B_0,25 M e AS-B_0,5 M foi realizada pelo método ABTS. Para cada amostra foram testadas três concentrações distintas, nomeadamente 50, 100 e 200 µg de polissacarídeo/mL.

Os resultados obtidos mostraram a inexistência de atividade antioxidante de todas as amostras testadas em todas as concentrações. Uma vez que está descrito na literatura que este tipo de polissacarídeos tem atividade antioxidante, por vezes determinada pelo método ABTS (81), é possível concluir que as concentrações de polissacarídeo utilizadas não são as suficientes para produzir essa atividade. Devido a limitações de quantidade de amostra disponível não foi possível repetir o ensaio com concentrações superiores.

4. CONCLUSÃO

Esta dissertação teve como objetivo a purificação e caracterização estrutural dos polissacarídeos presentes na água das salinas de Aveiro bem como a avaliação do seu potencial biológico. Verificou-se que através do processo de diálise de 1 L de água é possível obter 369 mg de material polimérico, sendo o componente maioritário deste material os açúcares (40 a 45%), seguidos pela proteína (11 a 17%) e, por último, pelos ésteres de sulfato (3%). Relativamente à sua composição em açúcares, os resíduos maioritários são os ácidos urónicos, a fucose e a galactose.

Concluiu-se que existe uma grande variabilidade na composição dos polissacarídeos da água das salinas, uma vez que estão presentes todos os monossacarídeos e algumas das ligações glicosídicas características dos vários polissacarídeos sulfatados existentes em ambientes marinhos. Assim sendo, os polissacarídeos da água das salinas são uma mistura dos vários polissacarídeos existentes no meio.

Pela cromatografia de troca aniónica foi possível separar três grupos de polissacarídeos com diferentes teores em sulfatos (0 µg/mg, 20 µg/mg e 60 µg/mg) e em proteína, mas com constituição semelhante em termos de composição em monossacarídeos. Pela cromatografia de exclusão molecular dos três grupos obtidos anteriormente foi possível separar quatro populações de polissacarídeos com diferentes pesos moleculares, sendo as duas populações de peso molecular aparente mais elevado aquelas que contêm maior quantidade de açúcares. A análise da estrutura revelou que, de uma forma geral, todas as frações eram constituídas pelo mesmo tipo de polissacarídeos. Estes polissacarídeos parecem estar associados entre si, pois não foi possível separá-los apesar de se usarem dois tipos de cromatografia diferentes.

Os passos de purificação utilizados permitiram obter frações com polissacarídeos estruturalmente ligeiramente diferentes, quer em termos de carga quer em termos de peso molecular, permitindo o estudo de uma possível relação entre a estrutura do polissacarídeo e a sua atividade biológica, nomeadamente antioxidante e atividade imunoestimuladora. As amostras não mostraram qualquer capacidade antioxidante nas condições testadas. No entanto, as amostras iniciais e todas as frações obtidas por troca iónica têm a capacidade de estimular a ativação de linfócitos B. Estes resultados permitem concluir que o teor de sulfatos não é determinante para a atividade imunoestimuladora destas amostras, pois mesmo a fração que não continha ésteres de sulfato apresentou esta atividade. As frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular designadas como “Grupo II”, ou seja, de peso molecular relativamente elevado mas inferior a 400 kDa, não

apresentaram capacidade imunoestimuladora, levando a crer que algum dos restantes três grupos obtidos pela cromatografia de exclusão molecular possa ter a atividade imunoestimuladora apresentada pelas amostras iniciais.

Concluindo, os polissacarídeos obtidos da água das salinas são constituídos por misturas de vários tipos de polissacarídeos descritos em ambientes marinhos, como os que são produzidos pelas algas. No entanto, a vantagem desta fonte é que são mais facilmente obtidos, necessitando apenas remover os compostos de baixo peso molecular, utilizando uma diálise ou um sistema de ultrafiltração. O facto da amostra inicial de polissacarídeos ter uma composição semelhante e atividade imunoestimuladora das frações obtidas na cromatografia de troca iónica permite concluir que não é necessária a purificação deste tipo de compostos para poderem ser utilizados como composto imunoestimulador em aplicações biomédicas e alimentares.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro SL, Oliveira RM, Sabry DA, Câmara RBG, Nobre LTDB, Costa MSSP, Almeida-Lima J, Farias EHC, Leite EL, Rocha HAO. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2010;64:21–28.
2. Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willats WGT, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB. Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews; 2011;62:567–590.
3. Wood CG. Seaweed extracts: A unique ocean resource. *Journal of Chemical Education*. American Chemical Society; 1974;51:449-452.
4. Alves A, Sousa RA., Reis RL. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology*. 2013;25:407–424.
5. Quemener B, Lahaye M, Bobin-Dubigeon C. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. *Journal of Applied Phycology*. 1997;9:179–188.
6. Jensen A. Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia*. 1993;260-261:15–23.
7. Michel C, Macfarlane GT. Digestive fates of soluble polysaccharides from marine macroalgae: involvement of the colonic microflora and physiological consequences for the host. *Journal of Applied Bacteriology*. 1996;80:349–369.
8. Laskin JD, Dokidis A, Sirak AA, Laskin DL. Distinct patterns of sulfated proteoglycan biosynthesis in human monocytes, granulocytes and myeloid leukemic cells. *Leukemia research*. 1991;15:515–523.
9. Rachmilewitz J, Tykocinski ML. Differential effects of chondroitin sulfates A and B on monocyte and B-cell activation: evidence for B-cell activation via a CD44-dependent pathway. *Blood*. American Society of Hematology; 1998;92:223–229.
10. Olson ST, Björk I. Mechanism of action of heparin and heparin-like antithrombotics. *Perspectives in Drug Discovery and Design*. 1994;1:479–501.
11. Lahaye M, Cimadevilla EEA-C, Kuhlenkamp R, Quemener B, Lognoné V, Dion P. Chemical composition and ¹³C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. Kluwer Academic Publishers; 1999;11:1–7.
12. Morya VK, Kim J, Kim EK. Algal fucoidan: Structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;93:71–82.
13. Preeprame S, Hayashi K, Lee JB, Sankawa U, Hayashi T. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2001;49(4):484–485.

14. Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Chizhov AO, Krupnova TN, Sundukova EV., Isakov V V. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2003;294:1–13.
15. Skriptsova A V., Shevchenko NM, Zvyagintseva TN, Imbs TI. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology*. 2009;22:79–86.
16. Robic A, Sassi J-F, Dion P, Lerat Y, Lahaye M. Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two ulva species (Chlorophyta) from the brittany coast. *Journal of Phycology*. 2009;45:962–973.
17. Mabeau S, Kloareg B, Joseleau J-P. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry*. Pergamon; 1990;29:2441–2445.
18. Lim SJ, Wan Aida WM, Maskat MY, Mamot S, Ropien J, Mazita Mohd D. Isolation and antioxidant capacity of fucoidan from selected Malaysian seaweeds. *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd; 2014;42:280–288.
19. Dore CCMPG, Alves MGCF, Will LSEP, Costa TG, Sabry DA, Rêgo LARS, Accardo CM, Rocha HAO, Filgueira LGA, Leite EL. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd.; 2013;91:467–475
20. Khil'chenko SR, Zaporozhets TS, Shevchenko NM, Zvyagintseva TN, Vogel U, Seeberger P, Lepenies B. Immunostimulatory Activity of Fucoidan from the Brown Alga *Fucus evanescens*: Role of Sulfates and Acetates. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2011;30:291–305.
21. Yuan H, Song J, Li X, Li N, Liu S. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of κ -carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. *Journal of Applied Phycology*. 2010;23:59–65.
22. Siqueira R, Silva M . In vivo anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. *Pharmaceutical biology*. 2011;49:167–174.
23. Li N, Mao W, Yan M, Liu X, Xia Z, Wang S, Xiao B, Chen C, Zhang L, Cao S. Structural characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Codium divaricatum*. *Carbohydrate Polymers*. 2015;121:175–182.
24. Vishchuk O, Ermakova S, Zvyagintseva T. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydrate Research*. 2011;346:2769–2776.

25. Kalitnik A, Barabanova A. Low molecular weight derivatives of different carrageenan types and their antiviral activity. *Journal of Applied Phycology*. 2012;25:65–72.
26. Ye H, Wang K, Zhou C, Liu J, Zeng X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food chemistry*. 2008;111:428–432.
27. Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S, Sánchez-Muniz FJ. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of medicinal food*. 2009;12:236–258.
28. Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd.; 2011;84:14–21.
29. Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydrate Research*. 2002;337:719–730.
30. Tako M. Rheological characteristics of fucoidan isolated from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. *Botanica marina*. 2003;46:461–465.
31. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*. 2008;13:1671–1695.
32. Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D’Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich GE, Berman AE, Bilan ML, Usov AI, Ustyuzhanina NE, Grachev AA, Sanderson CJ, Kelly M, Rabinovich GA, Iacobelli S, Nifantiev NE. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*. 2007;17:541–552.
33. Duarte ME, Cardoso MA, Nosedá MD, Cerezo AS. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate research*. 2001;333:281–293.
34. Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine drugs*. *Molecular Diversity Preservation International*; 2011;9:2106–2130.
35. Kaeffer B, Bénard C, Lahaye M, Blottière HM, Cherbut C. Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. *Planta medica*. 1999;65:527–531.
36. Bobin-Dubigeon C, Lahaye M, Guillon F, Barry J-L, Gallant DJ. Factors limiting the biodegradation of *Ulva* sp cell-wall polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997;75:341–351.

37. Robic A, Rondeau-Mouro C, Sassi J-F, Lerat Y, Lahaye M. Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). *Carbohydrate Polymers*. 2009;77:206–216.
38. Paradossi G, Cavalieri F, Pizzoferrato L, Liquori AM. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999;25:309–315.
39. Lahaye M, Inizan F, Vigoureux J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. *Carbohydrate Polymers*. 1999;36:239–249.
40. Schijf J, Ebling AM. Investigation of the ionic strength dependence of *Ulva lactuca* acid functional group pK(a)s by manual alkalimetric titrations. *Environmental science & technology*. American Chemical Society; 2010;44:1644–1649.
41. Siddhanta A, Goswami A. Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) of Indian waters. *Indian journal of Geo-Marine Sciences*. 2001;30:166–172.
42. Lahaye M, Cimadevilla E. Chemical composition and ¹³C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 1999;11:1–7.
43. Ray B, Lahaye M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva* “*rigida*” (ulvaes, chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydrate Research*. 1995 ;274:251–261.
44. Percival E, Wold JK. 1040. The acid polysaccharide from the green seaweed *Ulva lactuca*. Part II. The site of the ester sulphate. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. The Royal Society of Chemistry; 1963;5459-5468.
45. Lahaye M, Robic A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*. American Chemical Society; 2007;8:1765–1774.
46. McKinnell JP, Percival E. 606. Structural investigations on the water-soluble polysaccharide of the green seaweed *Enteromorpha compressa*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. The Royal Society of Chemistry; 1962;3141-3148.
47. Stanley N. Production, properties and uses of carrageenan. *Production and utilization of products from commercial seaweeds*. 1987;288:116–146.
48. Lai VMF, Wong PA-L, Lii C-Y. Effects of Cation Properties on Sol-gel Transition and Gel Properties of κ -carrageenan. *Journal of Food Science*. 2000;65:1332–1337.
49. Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina*. 2013;58:187–205.
50. Campo VL, Kawano DF, Silva DB, Carvalho I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers*.

Elsevier Ltd; 2009;77:167–180.

51. Velde F Van de, Knutsen S. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*. 2002;13:73–92.
52. Lahaye M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *Journal of Applied Phycology*. Kluwer Academic Publishers; 13:173–184.
53. De Ruiter GA, Rudolph B. Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*. 1997;8:389–395.
54. Miller I, Falshaw R, Furneaux R. The chemical structures of polysaccharides from New Zealand members of the Rhodomelaceae. *Botanica marina*. 1993;36:203–208.
55. Kolender A, Matulewicz M. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. *Carbohydrate research*. 2002;337:57–68. .
56. Canelón DJ, Ciancia M, Suárez AI, Compagnone RS, Matulewicz MC. Structure of highly substituted agarans from the red seaweeds *Laurencia obtusa* and *Laurencia filiformis*. *Carbohydrate polymers*. 2014;101:705–713.
57. Chiovitti A, Bacic A, Craik DJ, Munro SLA, Kraft GT, Liao M-L. Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. *Carbohydrate Research*. 1997;299:229–243.
58. Pomín VH. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review. *Glycoconjugate journal*. 2010 ;27:1–12.
59. Souza M, Marques CTC, Souza MCR, Marques CTC, Dore CMG, Silva FRF, Rocha HAO, Leite EL. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 2007;19:153–160.
60. Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*. 2011;9:196–233.
61. Ferreira SS, Passos CP, Madureira P, Vilanova M, Coimbra MA. Structure – function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd.; 2015;132:378–396.
62. Wang W, Zhou J. Immunomodulating action of marine algae sulfated polysaccharides on normal and immunosuppressed mice. *Chinese Journal of Pharm Toxicol*. 1994;8:199–202.
63. Raghavendran H, Srinivasan P, Rekha S. Immunomodulatory activity of fucoidan against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. *International immunopharmacology*. 2011;11:157–163.

64. Kim M-H, Joo H-G. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology letters*. 2008;115:138–143
65. Yang M, Ma C, Sun J, Shao Q, Gao W, Zhang Y, Li Z, Xie Q, Dong Z, Qu X. Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *International immunopharmacology*. 2008;8:1754–1760.
66. Barahona T, Encinas MV, Imarai M, Mansilla A, Matsuhira B, Torres R, Valenzuela B. Bioactive polysaccharides from marine algae. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2014;4:125–138. .
67. Castro R, Zarra I, Lamas J. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*. 2004;22:67–78.
68. Leiro JM, Castro R, Arranz JA, Lamas J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International immunopharmacology*. 2007;7:879–888.
69. Stephanie B, Eric D, Sophie FM, Christian B, Yu G. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd.; 2010;81:448–460.
70. Yuan H, Song J, Li X, Li N, Liu S. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of κ -carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. *Journal of Applied Phycology*. 2011;23:59–65.
71. Yuan H, Song J, Zhang W, Li X, Li N, Gao X. Antioxidant activity and cytoprotective effect of kappa-carrageenan oligosaccharides and their different derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2006;16:1329–1334.
72. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal*. 1984;219:1–14.
73. Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochemical research*. 2009;34:630–638.
74. Maillard M-N, Soum M-H, Boivin P, Berset C. Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. *LWT - Food Science and Technology*. 1996;29:238–244.
75. Gray JJ. Measurement of lipid oxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1978;55:539–546.
76. Hettiarachchy N. Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. *Journal of Food Science*. 1996;61:516–519.
77. Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2010;118:823–829.

78. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Song H, Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International journal of biological macromolecules*. 2010;46:6–12.
79. Li D, Xu R, Zhou W, Sheng X. Effects of fucoidan extracted from brown seaweed on lipid peroxidation in mice. *Acta Nutrimenta Sinica*. 2002;24:389–392.
80. Qi H, Zhang Q, Zhao T, Chen R, Zhang H, Niu X, Li Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *International journal of biological macromolecules*. 2005;37:195–199.
81. Shao P, Chen M, Pei Y, Sun P. In vitro antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophyten seaweeds *Ulva fasciata*. *International journal of biological macromolecules*. 2013;59:295–300.
82. Li B, Liu S, Xing R, Li K, Li R, Qin Y, Wang X, Wei Z, Li P. Degradation of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities. *Carbohydrate polymers*. 2013;92:1991–1996.
83. Shao P, Chen X, Sun P. In vitro antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. *International journal of biological macromolecules*. 2013;62:155–161.
84. Souza B, Cerqueira M, Bourbon A. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids*. 2012;27:287–292.
85. Chen D, Wu XZ, Wen ZY. Sulfated polysaccharides and immune response: promoter or inhibitor? *Panminerva medica*. 2008;50:177–183.
86. El-Baky HHA, El-Baz FK, El-Baroty GS. Potential biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae *Ulva lactuca* L. *Academic Journal of Cancer Research*. 2009;2:1–11.
87. Kim S-K, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*. 2010;2:1–9.
88. Silva IM. Análise da matéria orgânica associada ao sal marinho. Aveiro; 2014.
89. Quitério P. Caracterização dos polissacarídeos presentes no sal e salinas marinhas. Aveiro; 2014.
90. Salinas - extração do sal [Internet]. Available from: <http://www.maisnatureza.com/geral/salinas/>
91. McLusky DS, Elliott M. Transitional waters: A new approach, semantics or just muddying the waters? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2007;71:359–363. .
92. Engel A, Händel N. A novel protocol for determining the concentration and

- composition of sugars in particulate and in high molecular weight dissolved organic matter (HMW-DOM) in. *Marine Chemistry*. 2011;127:180–191.
93. Silva I, Nunes A, Rocha SM, Coimbra MA. Composition of food grade Atlantic salts regarding triacylglycerides, polysaccharides and protein. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015;41:21–29.
 94. DuBois M, Gilles KA., Hamilton JK, Rebers PA., Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 1956;28:350–356.
 95. Stevenson T, Furneaux H. Chemical Methods from Red Algae for the Analysis of Sulphated Galactans. *Carbohydrate Research*. 1991;210:277–298.
 96. Dodgson KS, Price RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *The Biochemical journal*. 1962;84:106–110.
 97. Coimbra, M, Delgadillo I, Waldron K SR. Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp. *Modern methods of plant analysis*. 1996. p. 19–44.
 98. Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 1984;131:209–217.
 99. Miller IJ, Blunt JW. Desulfation of algal galactans. *Carbohydrate Research*. 1998;309:39–43.
 100. Passos CP, Cepeda MR, Ferreira SS, Nunes FM, Evtuguin D V., Madureira P, et al. Influence of molecular weight on in vitro immunostimulatory properties of instant coffee. *Food Chemistry*. 2014;161:60–66.
 101. Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (abts) method to measure antioxidant capacity of Selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of agricultural and food chemistry*. American Chemical Society; 2006;54:1151–1157.
 102. Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SM, McDowell RA., Shashkov AS, Nifant'ev NE, Khatuntseva EA, Usov AI. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research*. 1999;320:108–119.
 103. Estevez JJM, Ciancia M, Cerezo AAS. The system of sulfated galactans from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* (Phyllophoraceae, Rhodophyta): Location and structural analysis. *Carbohydrate Polymers*. 2008;73:594–605.
 104. Aguilar-Briseño JA, Cruz-Suarez LE, Sassi J-F, Ricque-Marie D, Zapata-Benavides P, Mendoza-Gamboa E, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Avila LM. Sulphated polysaccharides from *Ulva clathrata* and *Cladosiphon okamuranus* seaweeds both inhibit viral attachment/entry and cell-cell fusion, in NDV infection. *Marine drugs*. 2015;13:697–712.

105. Jin W, Zhang W, Wang J, Ren S, Song N, Duan D, Zhang Q. Characterization of laminaran and a highly sulfated polysaccharide from *Sargassum fusiforme*. *Carbohydrate Research*. 2014;385:58–64.
106. Lechat H, Amat M, Mazoyer J, Buléon A, Lahaye M. Structure and distribution of glucomannan and sulfated glucan in the cell walls of the red alga *Kappaphycus alvarezii* (gigartinales, rhodophyta). *Journal of Phycology*. 2000;36:891–902.